Série A, N° 927
N° d'Ordre :
951

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

PAR

Evanghélos BRICAS

1ère THESE. — "Synthèse de quelques L-histidyl-, L-lysyl- et L-aspartyl-peptides".

2ème THESE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 6 juin 61 devant la Commission d'examen.

M. CHAMPETIER *Président.*

M. LEDERER
M. JULIA M. } *Examinateurs.*

Série A, N° 927
N° d'Ordre :
951

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

PAR

Evanghélos BRICAS

1ère **THESE.** – " Synthèse de quelques L-histidyl-, L-lysyl- et L-aspartyl-peptides ".

2ème **THESE.** – Propositions données par la Faculté.

Soutenues le ..... **devant la Commission d'examen.**

M. CHAMPETIER *Président.*

M. LEDERER
M. JULIA M. } *Examinateurs.*

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen : **J. PÈRÈS**

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
PERES	T	Mécanique des fluides et applications.
BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
PLANTEFOL	T	Botanique.
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés.
PREVOST	T	Chimie organique.
BOULIGAND	T	Analyse appliquée à la Géométrie.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale (ORSAY).
AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie.
CHRETIEN	T	Chimie minérale.
DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E.N.S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIERE	T	Géologie (ORSAY).
GAUTHERET	T	Biologie (P.C.B.).
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique Enseignement.
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.).
FORTIER	T	Mécan. expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.).
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
L'HERITIER	T	Biologie Générale (ORSAY).
GRIVET	T	Radioélectricité (ORSAY).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et struct.
JACQUINOT	T	Spectroscopie (ORSAY).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
PRUVOST	T	Géologie.
AMIEL	T	Chimie des solides.
HOCART	T	Minéralogie et cristallogr.
J.-P. MATHIEU	T	Recherches physiques.
COUTEAUX	T	Biol. animale (P.C.B.).
MAY	T	Zoologie (ORSAY).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale (P.C.B.).
GUINIER	T	Physique des solides (ORSAY).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités.
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéronaut.).
BRELOT	T	Calcul différentiel.
NORMANT	T	Synthèse organique générale.
BENARD	T	Chimie (E.N.S.C.P.).
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUE	T	Statistiques mathématiques.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale (E.N.S.).
MARECHAL	T	Optique théorique et appl.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiologie
SALEM	T	Mathématiques générales.
LELONG	T	Mathématiques générales.
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.).
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
PISOT	T	Calcul des probabilités.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMAN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.

LENNUIER	T	Physique (P.C.B.).
RIZET	T	Génétique (ORSAY).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Relativité.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie (P.C.B.).
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale.
BRUSSET	T	Chimie minérale.
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (ORSAY).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY		Biologie végétale (P.C.B.).
PIAUX	T	Chimie (S.P.C.N.).
BRUN	T	Mécan. expérimentale des fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agreg.).
Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique (M.P.C.).
DUBOIS J.-E.	T	Chimie (M.P.C.).
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
MICHEL André	T	Chimie minérale (ORSAY).
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Physique.
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER		Biologie animale (P.C.B.).
CAMUS		Biologie végétale (P.C.B.).
CASTAING	T	Physique (ORSAY).
CURIEN	T	Minéralogie et cristallogr.
MOYSE	T	Physiologie végétale (ORSAY).
PANNETIER	T	Chimie (ORSAY).
POSSOMPES	T	Biologie animale (P.C.B.).
PULLMANN		Chimie théorique.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité (ORSAY).
TONNELAT		Biologie physico-chim.
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART		Chimie (P.C.B.).
DODE	T	Chimie (ORSAY).
FREYMANN	T	Physique (S.P.C.N.).
GUINOCHET	T	Biologie végétale (ORSAY).
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.).
Mlle JOSIEN	T	Chimie (P.C.B.).
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Electronique (ORSAY).
CHAPELLE	T	Physique (ORSAY).
DELANGE	T	Mathématiques (ORSAY).
DENY	T	Mathématiques générales (ORSAY).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
LUCAS G.	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Physique fondamentale des hautes énergies (ORSAY).
BRICARD	T	Météorologie.
Mme ALBE-FESSARD		Psychophysiologie.
FRIEDEL		Physique des solides (ORSAY).
M. JULIA		Chimie organique structurale.
LENDER		Biologie animale (S.P.C.N.) ORSAY.
MAGAT		Physico-chimie des rayonnements.
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie.
MONOD	T	Biochimie cellulaire.
BENOIT	T	Physiologie animale (ORSAY).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie.
LEMEE	T	Physiologie B.M.P.V. (ORSAY).
GUERIN	T	Chimie (ORSAY).
CHATELET M.		Chimie (P.C.B.).
JEAN		Physique (ORSAY).
MATTLER	T	Physique (ORSAY).
MICHEL Louis		Physique théor. (ORSAY).
RUMPF		Chimie (P.C.B.).
BERGERARD		Biol. anim. (S.P.C.N.) (ORSAY).
BERTEIN		Electronique (ORSAY).
BOUISSIERES		Chimie des radioéléments (ORSAY).
Mme COUTURE		Thermodynamique et mécanique physique.
ELLENBERGER		Géologie appliquée.
FRANC		Biol. animale (P.C.B.).
SCHNELL		Botanique tropicale (ORSAY).
STOLKOWSKI		Biol animale (P.C.B.).
ACHER		Chimie biol. (ORSAY).
BAUDOIN		Biologie.
BEAUMONT		Biologie animale.
BLAMONT		Géophysique ionosphère.
BOURREAU		Biologie végétale (S.P.C.N.) (ORSAY).
CURIE D.		Physique (M.G.P.).
DURAND-DELGA		Géologie.
FREON		Chimie organique (ORSAY).
HELLER		Physiologie végétale.
TORTRAT		Calcul des probabilités.
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.).
MAGNAN	T	Physique (P.C.B.).
DAUDEL		Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
Mlle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.).
BARRAUD		Physiologie cellulaire.
NOIROT		Evolution des êtres organisés.
Mme Foures-Bruhat	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
Mlle VEIL		Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNSCK	T	Mécanique physique et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie (ORSAY).
BROCHARD	T	Physique P.C.B. (ORSAY).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathématiques M.P.C. (ORSAY).
MAZET	T	Mécanique générale (ORSAY).

Secrétaire général : R. POULLAIN

Ce travail a été réalisé dans le
Laboratoire de Chimie biologique
de la Faculté des Sciences de Paris
dont la confiance de Monsieur le Professeur Cl. FROMAGEOT
m'a ouvert les portes en 1952.
Je tiens à exprimer ici le témoignage de ma reconnaissance.

J'adresse aussi mes vifs remerciements
à Monsieur le Professeur P. DESNUELLE
qui a bien voulu à diverses reprises s'intéresser
à mon activité scientifique.

Je tiens à exprimer également mes sentiments de sincère
gratitude envers Monsieur le Professeur E. LEDERER
Directeur du Laboratoire de Chimie biologique de la
Faculté des Sciences de Paris
L'intérêt qu'il a bien voulu montrer pour ce travail et
ses suggestions ont été pour moi une aide et un
encouragement précieux.

A mon frère Maurice.

SYNTHESE DE QUELQUES L-HISTIDYL-, L-LYSYL- ET L-ASPARTYL-PEPTIDES.

I N T R O D U C T I O N

L'importance théorique et pratique de la synthèse peptidique n'a pas cessé de croître ces dix dernières années. Les groupes de chercheurs qui s'y consacrent dans plusieurs pays se sont multipliés et le champ d'action de cette discipline s'est notablement élargi.

L'efficacité des méthodes récemment introduites et l'expérience acquise grâce aux multiples synthèses de peptides naturels ont permis de résoudre plusieurs problèmes de la synthèse peptidique. Cependant, diverses questions importantes restent encore à l'étude et évoluent constamment sous la poussée de nouvelles exigences.

Parmi ces dernières, le problème de l'incorporation des différents acides aminés trifonctionnels dans une chaine peptidique constitue une des préoccupation majeures des spécialistes, si l'on en juge d'après le nombre des publications consacrées à ce sujet.

Le travail dont nous exposons ici les résultats concerne principalement trois acides aminés trifonctionnels : l'histidine, la lysine et l'acide aspartique. Il rapporte quelques exemples d'incorporation de ces acides aminés dans la chaine peptidique, dans des conditions qui éliminent tout danger de racémisation et qui empêchent la participation des groupements fonctionnels de la chaine latérale et du noyau imidazolique à des réactions secondaires.

Ce travail a été fait dans le Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Paris, dirigé à cette époque par Monsieur le Professeur Cl. FROMAGEOT qui a bien voulu nous y accueillir et nous charger de l'organisation d'une unité de synthèse de peptides.

L'équipement spécial que nous avons installé dans ce but nous a permis, avant d'entreprendre le présent travail, d'apporter le concours de la synthèse à la solution de quelques problèmes posés par le travail de certaines équipes de ce Laboratoire : ainsi, pour confirmer la nature de l'"hypotaurine", isolée par B. BERGERET et F. CHATAGNER comme produit du métabolisme de l'acide cystéine-sulfinique, nous avons effectué, avec M. F. KIEFFER, une nouvelle synthèse de l'acide amino-2-éthane-sulfinique, par l'application des méthodes couramment utilisées dans la synthèse peptidique (E. BRICAS, F. KIEFFER et Cl. FROMAGEOT, Biochim. Biophys. Acta 18, 358,(1955) De même, pour permettre l'étude de la spécificité d'une nouvelle protéinase, isolée par L. COLOBERT à partir du milieu de culture de la bactérie Sarcina flava (Coccus P) nous avons synthétisé les substrats peptidiques spécifiques des divers enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase A et aminopeptidase)(L.COLOBERT, Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, Paris 1955 p. 70 et Bull.Soc.Chim.Biol. 40, 423 (1958)). Les recherches de R. MONNIER et coll. sur l'existence parmi les enzymes protéolytiques de Cl. histolyticum d'une endopeptidase, capable d'hydrolyser les liaisons iminopeptidiques, nous ont donné l'occasion de préparer les substrats : carbobenzoxy-glycyl-L-proline et carbobenzoxy-glycyl-L-proline amide (R. MONNIER et coll., Biochim.Biophys.Acta 18, 71 (1955)).

Après ces synthèses occasionnelles, nous avons commencé le présent travail à une période où plusieurs des méthodes et des réactifs, aujourd'hui en usage, venaient d'être proposés. Les problèmes dont nous avons entrepris l'étude ont évolué en même temps que les divers nouveaux procédés proposés pour la synthèse de ces peptides, et notre travail a fait son chemin à travers les multiples changements apportés par les

progrès continuels dans ce domaine à un moment où les grandes lignes de cette évolution n' étaient pas encore nettement dégagées.

C'est pourquoi nous avons considéré indispensable de précéder l'exposé de notre propre travail par un examen général des acquisitions récentes de la synthèse peptidique, en mettant l'accent sur les conclusions générales qui s'en dégagent et qui ont guidé notre travail : c'est le sujet de la PREMIERE PARTIE de notre exposé et des sept tableaux qui l'accompagnent, dans lesquels nous avons résumé une grande partie des données actuelles.

Dans la DEUXIEME PARTIE, nous avons traité la synthèse des histidyl-peptides : après avoir examiné dans l'INTRODUCTION les différentes méthodes décrites dans la littérature, et discuté les résultats de leur application, nous exposons les principes d'une nouvelle méthode de synthèse d'histidyl-peptides que nous avons élaborée. Elle consiste à utiliser comme intermédiaire un dérivé de l'histidine protégé à la fois sur les fonctions amine et imine, mais par des groupements de protection temporaire s'éliminant indépendamment, le groupement protégeant la fonction imine pouvant rester fixé même après l'élimination du groupement qui protège la fonction amine. Cette méthode, qui fait disparaitre certains inconvénients des méthodes précédentes permet, pour la première fois, d'employer des dérivés de l'histidine protégés sur le noyau imidazolique dans la construction d'une chaine peptidique, par la voie récurrente qui écarte le risque de racémisation.

Les résultats obtenus par l'utilisation de cette méthode pour la synthèse d'un dérivé du tétrapeptide Val-His-Pro-Phe correspondant à la séquence C-terminale de l'angiotensine du serum de boeuf (octapeptide) sont exposés sommairement dans cette partie avant d'être décrits dans la PARTIE EXPERIMENTALE.

La TROISIEME PARTIE est consacrée à la synthèse de quelques peptides-substrats de la trypsine qui reproduisent certains éléments de structure appartenant à la séquence N-terminale du trypsinogène. Ces peptides sont destinés à servir de "modèles"

pour une étude ultérieure de certains aspects de la spécificité de la trypsine, mis en évidence par les recherches des équipes de DESNUELLE et de NEURATH sur les transformations de la structure primaire pendant l'activation autocatalytique du trypsinogène.

Leur synthèse concerne principalement l'incorporation de la lysine et éventuellement de l'acide aspartique dans une chaine peptidique qui comporte la séquence L-isoleucyl-L-valine en position C-terminale.

Les différents problèmes envisagés au cours de ces synthèses étaient les suivants :

1) l'effet stérique d'une chaine latérale ramifiée en β, dans le cas des résidus isoleucine et valine

2) le choix des groupements adéquats pour la protection temporaire des fonctions α- et ε-amine de la lysine, de sorte qu'on puisse prolonger la chaine du côté N-terminal tout en conservant la protection de la fonction ε-amine

3) le choix des groupements adéquats pour la protection temporaire des fonctions α- et β-carboxyle, de sorte qu'on puisse les éliminer sans provoquer de réactions secondaires (transposition de la liaison α-aspartyl- en β-aspartyl-)

4) l'existence de certaines réactions parasites constatées pendant ces synthèses (formation d'une amide pendant la transformation de l'hydrazide d'un acide aminé en azide, formation de dicétopiperazines)

Dans cette partie, nous décrivons les moyens adoptés pour résoudre ces problèmes, dans le cas de nos synthèses, en nous référant en même temps aux procédés analogues décrits dans la littérature.

Les résultats obtenus pendant la synthèse de ces peptides qui comportent les acides aminés lysine, isoleucine, valine et acide aspartique (tétra-, tri- et dipeptides) sont discutés sommairement dans cette partie, avant d'être décrits en détail dans la PARTIE EXPERIMENTALE.

Dans cette dernière, enfin, nous avons décrit les différentes étapes des synthèses effectuées et les propriétés caractéristiques des composés préparés pour la première fois ou obtenus pour la première fois à l'état cristallisé ou avec des constantes différentes de celles données dans la littérature. Nous avons réuni en un tableau les valeurs R_F, dans plusieurs mélanges de solvants, de nombreux dérivés peptidiques des différents acides aminés. Dans cette PARTIE EXPERIMENTALE, nous avons également décrit la préparation de certains réactifs utilisés dans la synthèse peptidique (chlorure de carbobenzoxy, suivant un procédé qui donne de meilleurs résultats que la méthode décrite dans Organic Syntheses).

Les conclusions qui se dégagent de la PREMIERE PARTIE ainsi qu'une brève récapitulation des résultats de la DEUXIEME et TROISIEME PARTIE sont données séparément à la fin de chacune de ces parties.

Le point commun entre les deux principales synthèses décrites dans la DEUXIEME et TROISIEME PARTIE est la synthèse de peptides avec participation d'acides aminés trifonctionnels dont la troisième fonction est bloquée par un groupement de "protection temporaire", ainsi que l'incorporation de ces dérivés dans une chaine peptidique dans des conditions qui éliminent le risque de racémisation (synthèse par voie récurrente).

La conclusion générale que l'on peut tirer de cet ensemble peut se résumer ainsi : si la construction d'une chaine peptidique avec la participation de divers acides aminés peut se faire suivant un schéma d'application plus ou moins général, par contre, le choix des groupements de protection temporaire pour les fonctions principales ou latérales, ainsi que la préférence pour l'emploi de telle ou telle méthode de couplage, sont déterminés par la composition en acides aminés et par leur séquence particulière dans le peptide envisagé, et ne peuvent se faire qu'après des essais et des tâtonnements.

PREMIERE PARTIE

ACQUISITIONS RECENTES DANS LE DOMAINE DE LA SYNTHESE DES PEPTIDES

Aperçu historique

Dès ses débuts et dans toute son évolution ultérieure, la synthèse chimique des peptides se trouve étroitement liée au développement de nos connaissances sur la structure des protéines et des peptides naturels.

Au début de ce siècle, Théodor CURTIUS (1) et Emil FISCHER (2) élaboraient les premières méthodes de synthèse des peptides, essentiellement pour pouvoir fournir des arguments à l'"hypothèse peptidique", formulée par HOFMEISTER (3) et par FISCHER (4). A cette époque, on avait déjà isolé la plupart des acides α-aminés par hydrolyse des protéines, mais en ce qui concerne le mode de liaision de ces composés au sein de la molécule protéique, l'incertitude était complète.

La synthèse chimique permit, pour la première fois, d'obtenir des peptides, considérés comme modèles réduits de ces entités hypothétiques qui entrent dans la composition des protéines. En effet, dans l'esprit de FISCHER qui avait introduit le nom "peptide", ces substances synthétiques étaient "bien proches des peptones naturelles" considérées par lui comme "un mélange inséparable de polypeptides" (5).

En 1907, OSBORN et CLAPP (6) isolent une substance cristallisée, composée de proline et de phénylalanine, obtenue par hydrolyse partielle de la gliadine. Deux ans plus tard, FISCHER et LUNIAK (7) apportent la preuve de la structure de ce premier peptide isolé à partir d'une protéine, en comparant ses propriétés avec celles du peptide L-prolyl-L-phénylalanine obtenu par synthèse.

Mais des progrès importants dans cette direction ne pouvaient se faire avant le développement de méthodes d'analyse applicables à l'étude de la structure des chaines peptidiques.

Cependant, l'obtention par synthèse de peptides optiquement actifs, composés de différents acides aminés[+] permettait aux chimistes de se familiariser avec les propriétés particulières de ces substances à la fois uniformes et variées. Uniformes par une série de caractères communs (électrolytes amphotères, présence dans leur structure de la même liaison amide ainsi que d'atomes de carbone asymétriques) et variés par la diversité des chaines latérales et leur réactivité différente.

A cette période de début, la synthèse peptidique est basée sur les travaux classiques de CURTIUS qui préparait des N-benzoyl-peptides par sa méthode aux azides (1) et de FISCHER qui utilisait, dans le même but, le chlorure d'acide des dérivés carbethoxy des acides aminés (9). Mais, par ces méthodes, on ne pouvait pas obtenir de peptides libres : pour y parvenir il fallait soumettre les dérivés benzoylés ou carbethoxy à une hydrolyse qui ne laisse pas intacte la liaison peptidique.

Pour contourner cette difficulté, FISCHER et OTTO (10) ont introduit une méthode ingénieuse qui consiste à coupler un acide aminé avec le chlorure d'acide α-halogéné de structure correspondant à un acide aminé déterminé ; après la formation de la liaison amide, ils substituaient l'halogène par un groupement amine, en traitant le produit obtenu par l'ammoniac. Cette méthode, assez commode dans le cas d'un acide α-halogéné relativement simple et sans carbone asymétrique, se complique par des réactions secondaires et par une inversion de Walden intervenant pendant l'amination des dérivés α-halogénés optiquement actifs, qui d'ailleurs sont loin d'être faciles à préparer. Néanmoins, FISCHER et ses collaborateurs, comme aussi ABDERHALDEN, ont obtenu le maxi-

---

[+] Dans une rétrospective de ses travaux effectués jusqu'en 1906, FISCHER (8) énumérait la synthèse d'une soixantaine de peptides.

mum de ce que l'on peut tirer de ces méthodes difficiles et sont arrivés, le premier jusqu'à la synthèse d'un octadécapeptide (11), le second jusqu'à un nonadecapeptide (12). Mais les limitations de ces méthodes se révèlent même dans cet exploit difficile, puisque cette longue chaine peptidique était constituée uniquement par la répétition des resïdus glycyle et leucyle.

Cependant, le manque d'une méthode générale pour la synthèse des peptides continue à freiner le développement dans ce domaine jusqu'en 1932, date à laquelle BERGMANN et ZERVAS introduisirent la "méthode au carbobenzoxy" (13). En utilisant les dérivés N-carbobenzoxy des acides aminés et le couplage par les azides ou par les chlorures d'acides de ces dérivés, ces auteurs arrivent à préparer des peptides libres, après l'élimination du groupement N-carbobenzoxy par hydrogénation catalytique en présence de palladium.

La généralité et la fécondité de cette méthode très ingénieuse s'affirme par la synthèse de peptides variés, optiquement actifs, et dans lesquels entrent non seulement les acides aminés habituels mais aussi les acides glutamique et aspartique (13, 14), la lysine (15), l'arginine (16) et plus tard, grâce à du VIGNEAUD, la cystine et la cystéine (17).

La synthèse des peptides naturels connus à cette époque, la carnosine (18) et le glutathion est effectuée par HARRINGTON et MEAD (19) et du VIGNEAUD et MILLER (20), par l'application de cette méthode.

Les progrès réalisés durant cette période dans les méthodes d'isolement et de purification des enzymes protéolytiques, ont permis à BERGMANN et à son école d'entreprendre l'étude de la spécificité de ces enzymes à l'aide de substrats peptidiques simples, obtenus par synthèse. La synthèse peptidique a permis, par ce moyen, de définir en termes structuraux la spécificité de la trypsine et de la chymotrypsine, de la papaïnase et de la carboxypeptidase (21). Elle fournira ainsi de précieux instruments qui serviront plus tard à l'étude de la structure des chaines peptidiques.

L'introduction de la méthode de Bergmann et Zervas a marqué la période moderne de la synthèse peptidique : la quasi-totalité de 300 dérivés peptidiques énumérés dans la revue d'ensemble écrite en 1949 par FRUTON (22) sont des dérivés carbobenzoxy.

D'autre part, les méthodes d'analyse et de séparation des acides aminés et des peptides, grâce à un arsenal de nouvelles techniques (chromatographie et électrophorèse sur papier, chromatographie sur des résines synthétiques et séparation par distribution à contre-courant) évoluent très rapidement de leur côté.

Avec ces nouveaux moyens d'investigation, il devient possible d'isoler à l'état pur un nombre important de peptides naturels (23). La connaissance de leur composition exacte en acides aminés, ainsi que l'étude de leur structure ne tardent pas à suivre. Les progrès dans cette voie sont favorisés par le fait que, dans la plupart des cas, ces peptides naturels possèdent des propriétés physiologiques importantes (24).

Ainsi, à partir des années 40, on assiste à un développement rapide des méthodes qui permettent de déterminer les acides aminés terminaux ainsi que la séquence des résidus d'acides aminés des petites chaines peptidiques. La détermination de la séquence de cinq acides aminés différents qui entrent dans la composition du peptide à propriétés antibiotiques, la gramicidine S, par l'application de ces méthodes, était le premier pas dans cette direction (25). Il fut suivi par plusieurs autres, concernant différents peptides naturels et des chaines peptidiques des diverses protéines.

La nécessité de confirmer, par la synthèse, l'exactitude de la structure proposée pour ces peptides naturels, offre l'occasion de mettre à l'épreuve les possibilités des méthodes existantes et pousse à la recherche de nouvelles.

Ainsi, par cette intéraction réciproque du développement des méthodes d'analyse et de synthèse se produit une nouvelle floraison de travaux concernant la synthèse chimique des peptides, que l'on peut constater en comparant les revues d'ensemble sur la synthèse peptidique, écrite en 1956 et 1959 par GRASSMANN et WUNSCH (26)

TABLEAU I

Peptides naturels synthétisés entre 1953 et 1960

Nom du peptide	Résidus d'ac. aminés	1ère synthèse	Références
OCYTOCINE	9	1953	du Vigneaud (28) Anderson (29) Boissonnas (30) Rudinger (31) Bodanszky (32) Velluz (33) Beyermann (34) et leurs coll.
Lys-VASOPRESSINE	9	1957	du Vigneaud (35) Boissonnas(36) et leurs coll.
Arg-VASOPRESSINE	9	1958	du Vigneaud (37) Young (38) et leurs coll.
NATRIFERINE = vasotocine	9	1958	Katsoyannis et du Vigneaud(39)
ANGIOTENSINES I	10	1958	Schwyzer et coll.(40)Wünsch(41)
ANGIOTENSINES II	8	1957	Schwarz (42) Schwyzer (43) Paul et Anderson (44).
SUBSTRAT DE LA RENINE	14	1958	Skeggs et coll. (45)
BRADYKININE	9	1960	Boissonnas (46) Schwyzer (47) Nicolaïdes (48) et leurs coll.
α-MELANOSTIMULINE α-MSH	13	1959	Guttmann et Boissonnas (49) Hofmann et coll. (50)
β-MELANOSTIMULINE β-MSH	18	1959	Schwyzer et coll. (51)
CORTICOTROPINE (ACTH)	39 (23)*	(1960)	(Hofmann(52) Boissonnas (53) Schwyzer (54) et leurs coll. Schröder et Gibian (56)).
STREPOGENINES	5.(	1956	Woolley et coll.(57, 58) Okawa (59).
GRAMICIDINE S	2 x 5	1956	Schwyzer et Sieber (60)
TYROCIDINE A	10	(1960)*	(Schwyzer et coll.(61))
ACTINOMYCINE C_3	2 x 5	1960	Brockmann et Lackner (62)
POLYMYXINE B	10	1959	Vogler et coll. (63)

* Entre parenthèses les synthèses partielles.

et par GOODMAN et KENNER (27), avec celle de FRUTON (22) qui date de 1949.

La période actuelle

Les progrès réalisés ces dix dernières années se sont traduits par une remarquable série de synthèses de peptides naturels : inaugurée en 1953 par du VIGNEAUD avec la première synthèse de l'ocytocine (28a), elle fut suivie par plusieurs autres pour aboutir récemment à l'obtention, par synthèse, d'un fragment de 23 résidus d'acides aminés, possédant l'activité hormonale de l'ACTH (52).

Dans le TABLEAU I, nous avons énuméré les plus importantes de ces synthèses qui ont ouvert à la synthèse peptidique des perspectives nouvelles.

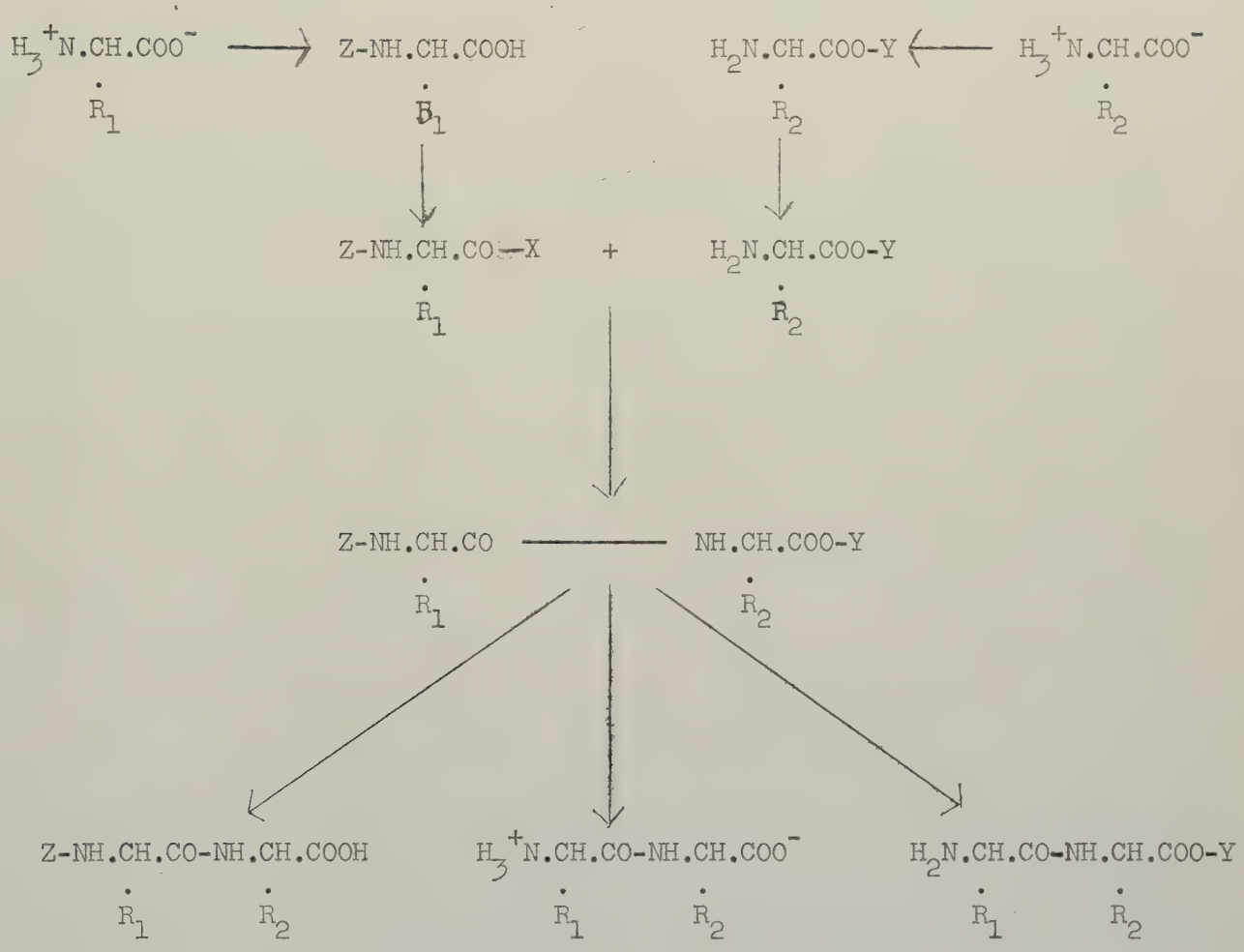
En effet, grâce à ces réalisations dans le domaine des hormones, des facteurs de croissance et des antibiotiques, la synthèse chimique des peptides intéresse aujourd'hui un cercle beaucoup plus vaste que celui des chimistes organiciens. Son importance pour la biochimie ne se limite pas seulement à confirmer la structure proposée ou à la corriger, comme cela s'est produit dans le cas de la Bradykinine (46). En réalisant, par synthèse, des "analogues de structure" des peptides physiologiquement actifs[+] la synthèse peptidique promet d'apporter une contribution fondamentale à l'étude des relations entre la structure et les propriétés biologiques.

D'autre part, l'intérêt de ces progrès pour la médecine n'a pas besoin d'être souligné : il suffit de citer la production à l'échelle industrielle, par voie de synthèse, d'un certain nombre de ces substances peptidiques, utilisées couramment dans la pratique médicale, - la synthèse chimique s'étant révélée plus rentable que leur isolement à partir des sources naturelles[++].

[+] Dans le cas de l'ocytocine et de la Lys-vasopressine, le nombre des "analogues" déjà synthétisés dépasse 40.

[++] On peut citer l'exemple des Laboratoires de Chimie pharmaceutique SANDOZ et de la Société Anonyme CIBA, à Bâle, qui fabriquent, par synthèse, les premiers l'ocytocine, la seconde l'hypertensine.

SCHEMA DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE PAR PROTECTION TEMPORAIRE DES GROUPES FONCTIONNELS



Z = groupement protecteur de la fonction amine

Y = groupement protecteur de la fonction carboxyle

X = groupement "activateur" du carboxyle.

Il est incontestable que ces résultats ont été obtenus grâce à l'amélioration des méthodes utilisées pendant les différentes étapes de la synthèse peptidique.

Pour mieux situer les problèmes particuliers qui ont fait l'objet de notre travail, nous allons passer en revue les acquisitions récentes dans les méthodes de la synthèse peptidique.

Synthèses peptidiques par protection temporaire des groupes fonctionnels.

La construction par synthèse d'une chaine peptidique correspondant à une structure déterminée s'effectue par étapes successives. Cette synthèse par étapes peut se réaliser, en principe, suivant trois voies différentes. Dans les deux premières, on accroche l'un après l'autre les différents acides aminés, en commençant soit par le bout N-terminal et en avançant vers le bout C-terminal, soit inversement en commençant par le bout C-terminal et en progressant vers le bout N-terminal (synthèse récurrente). Suivant la troisième voie, on procède par jonction de morceaux peptidiques eux-mêmes obtenus soit par jonction de fragments plus petits, soit par synthèse à partir des acides aminés suivant l'une des deux premières voies. Nous examinerons ultérieurement les avantages et les inconvénients de chacun de ces trois procédés. Retenons pour le moment que le processus élémentaire, commun à ces trois procédés, consiste à former la liaison peptidique entre le groupement α-carboxyle d'un premier acide aminé et le groupement α-aminé d'un second.

D'après le schéma classique de la synthèse des peptides par le procédé général de la protection temporaire des groupements fonctionnels, on procède par les étapes suivantes : (voir SCHEMA de la page ci-contre).

Dans une première étape, on procède à la protection temporaire des groupements chimiques qui ne doivent pas participer à la formation de la liaison peptidique. Ensuite, on effectue l'"activation" des fonctions chimiques qui formeront la liaison

TABLEAU II. Protection temporaire de la fonction amine.

Groupement protecteur	Formule et abréviations	Réactifs d'élimination	Date	Références
Carbobenzoxy- ou benzyloxycarbonyl-	$C_6H_5CH_2OCO-$ Cbz ou Z	H_2/Pd, Na/NH_3 liq. (18) HBr/CH_3COOH (64)	1932	Bergmann et Zervas (13)
p-nitro-carbobenzoxy	p-$NO_2C_6H_4CH_2OCO-$	idem	1952	Carpenter et Gish (65)
p-(phenylazo)benzyloxycarbonyl-	$C_6H_5N{:}NC_6H_4CH_2OCO-$ PZ	idem	1958	Schwyzer et coll. (66)
p-(methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl-	$CH_3OC_6H_4N{:}NC_6H_4CH_2OCO-$ MZ	idem		
Cyclopentyloxycarbonyl-	C_5H_9OCO-	HBr/CH_3COOH	1957	McKay et Albertson (67)
Cyclohexyloxycarbonyl-	$C_6H_{11}OCO-$	Résist. à H_2/Pd		
t-butyloxycarbonyl	$(CH_3)C.OCO-$ BOC	Acidolyse facile F_3CCOOH (61b)	1957	McKay et Albertson (67) Carpi (68) Anderson et McGregor (6
p-toluenesulfonyl- (tosyl)	p-$CH_3C_6H_4SO_2-$ TOS	Na/NH_3 liq. (71) Résist. à H_2/Pd	1926 1936	Schönheimer (70) du Vigneaud et Berhens (71)
Benzylsulfonyl-	$C_6H_5CH_2SO_2-$	Na/NH_3 liq. Nickel Raney	1957	Milne et Peng (72)
Benzyl- Dibenzyl-	$C_6H_5CH_2-$ $(C_6H_5CH_2)_2=$	H_2/Pd à 80°	1954	Velluz et coll. (73) Anatol et Torelli (74)
Triphenylmethyl- (trityl)	$(C_6H_5)_3C-$ Tri	Acidolyse facile HCl/CH_3OH, CH_3COOH H_2/Pd (effets stériques)	1925 1955	Helferich et coll. (73) Amiard et coll. (76) Zervas et coll. (7

Trifluoroacetyl-	F_3CCO-	TFA	Alcali dilué	1952	Weygand et Csendes (78) Schallenberg et Calvin (79
Phtalyl-	$C_6H_4(CO)_2$=	Pht.	Hydrazine (83) Phénylhydrazine (84)	1949 1960	Kind et Kidd (80) Sheehan e Frank (81) Nefkens (82)
Formyl-	HCO-	For	Acidolyse ou oxydation par H_2O_2 à 50° (87)	1953 1960	Waley (85) Sheehan et Yang (86) Losse (87)
Phenylthiocarbonyl-	C_6H_5SCO-		(Acétate de plomb)	1947	Ehrenswärd (88)
Benzylthiocarbonyl-	$C_6H_5CH_2SCO$-		Acide perbenzoïque à 0° (90)	1956	Kollonitsch et coll. (89)

peptidique et le couplage proprement dit. Dans une troisième étape, enfin, on élimine les groupements protecteurs. Cette élimination est totale quand il s'agit d'obtenir le peptide libre, ou partielle si l'on envisage la prolongation de la chaine peptidique du côté N- ou C-terminal.

Protection temporaire de la fonction amine.

Ces dernières années, les efforts des chimistes ont été dirigés spécialement vers la recherche de nouveaux réactifs pour la protection temporaire et spécifique des différents groupements fonctionnels que l'on doit "masquer" pendant la synthèse peptidique. Ainsi, beaucoup de nouveaux réactifs ont été proposés. De même, un certain nombre de réactifs anciennement connus ont été remis en valeur grâce à des améliorations récemment introduites.

Dans le TABLEAU II, nous avons énuméré les principaux réactifs de protection de la fonction amine dont on dispose aujourd'hui. En parcourant ce tableau, on peut constater, qu'en plus du groupement carbobenzoxy qui continue à avoir la plus large application, on peut utiliser maintenant un nombre important d'autres réactifs, dont l'application présente divers avantages suivant le problème envisagé.

Si l'on examine les méthodes que l'on peut utiliser pour éliminer les différents groupements de protection, on remarque que les réactions mises en oeuvre à cet effet peuvent se classer en cinq catégories :

1.- Réduction a) par H_2/Pd (carbobenzoxy et analogues, trityl)
b) par Na/NH_3 liq. (tosyl et benzyl-sulfonyl)

2.- Oxydation a) par H_2O_2 à 50° (formyl)
b) par C_6H_5COOOH à 0° (phényl-thio et benzyl-thio-carbonyl)

bis

TABLEAU III

Protection temporaire de la fonction carboxyle

mposé utilisé	Elimination par :	Remarques	Références
l avec métaux calins l avec bases rtiaires	Acidification	Protection imparfaite, application limitée	
ster méthylique ster éthylique	Hydrolyse alcaline	Résistance à H_2/Pd Difficultés avec les esters de l'isoleucine	Réactions secondaires (90,91) (92)
ster benzylique	H_2/Pd	Légère acidolyse par HBr/CH_3COOH (64a)	Miller et Waelsch (93) Erlanger et Hall (94) Cipera et Nicholls (95)
ster p-nitro nzylique	H_2/Pd	Résist. à HBr/CH_3COOH	Schwyzer et Sieber (61a) Schwarz et Arakawa (96)
ster cyclo- ntylique	Acidolyse HBr/CH_3COOH	Résist. à H_2/Pd	McKay et Albertson (67)
ster butylique rtiaire	Acidolyse $F_3C.COOH$	Résist. à H_2/Pd	Roeske (97) Tachner et coll.(98) Anderson et Callahan (100)
ster p-nitro- nylique	Utilisé tel quel pour un second couplage		Goodman et Stueben (101)
drazide protégé par Cbz ou par Tri par BOC)	Utilisé comme groupement de protection du COOH et après l'élimination du groupement protecteur de l'hydrazide, transformé en azide, sert pour un nouveau couplage		Hofmann et coll. (102) Weygand et coll. (103) Schwyzer et coll. (61b) Boissonnas et coll.(46b)

3. - Acidolyse a) par HBr/CH_3COOH (carbobenzoxy, cyclopentyl- et cyclohexyl-oxycarbonyl)

b) HCl/CH_3OH (formyl, trityl)

c) CH_3COOH (trityl)

d) F_3CCOOH (t-butyloxycarbonyl)

4. Hydrazinolyse H_2NNH_2 ou $C_6H_5NHNH_2$ (phtalyl)

5. Hydrolyse alcaline $NaOH/CH_3OH$ (trifluoroacétyl)

Ainsi, par le jeu de ces différentes réactions, on dispose d'un large éventail de possibilités pour protéger plusieurs groupements amine présent dans une chaine, et pour les éliminer sélectivement les uns après les autres. Il faut noter que, parmi ces réactions, la plus en faveur aujourd'hui est l'acidolyse qui peut s'appliquer pour éliminer des groupements de protection assez variés, suivant les acides et la température utilisés. Elle possède, en outre, l'avantage de pouvoir s'appliquer dans le cas de longues chaines peptidiques, où l'hydrogénation catalytique habituelle ne s'effectue pas avec une vitesse appréciable.

Protection temporaire de la fonction carboxyle.

Pour la protection de la fonction carboxyle (terminale ou latérale), on peut appliquer aujourd'hui une plus grande variété de moyens qu'il y a quelques années : le TABLEAU III en donne l'inventaire.

Les esters benzyliques, introduits dans la synthèse peptidique depuis longtemps (15b), ne sont devenus d'un usage courant que ces dernières années par le développement des méthodes qui ont rendu plus facile leur préparation (95).

Les esters butyliques tertiaires des acides aminés, devenus accessibles dernièrement, ont élargi davantage les possibilités de synthèses.

D'autre part, l'utilisation des esters p-nitrophényliques et des hydrazides

protégés, pour masquer le carboxyle pendant un premier couplage et l'"activer" ensuite pour effectuer un second couplage, constitue une variante ingénieuse de la synthèse peptidique récemment proposée sur laquelle on reviendra plus loin.

Par l'emploi de ces différents esters pour la protection de plusieurs groupements carboxyles d'une chaine peptidique, il est possible maintenant de procéder à leur élimination sélective par étapes et de libérer ces différents carboxyles sans appliquer l'hydrolyse alcaline.

Protection temporaire dans le cas des acides aminés trifonctionnels.

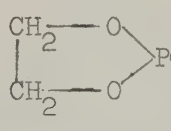
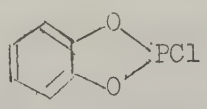
Dans le schéma général, on a considéré la présence des groupements α-aminés et α-carboxyles seulement. Il est évident que la synthèse des peptides avec la participation des acides diaminés monocarboxyliques et monoaminés dicarboxyliques ajoute des complications par la présence de groupements fonctionnels dans la chaine latérale. La protection de ceux-ci est nécessaire au même titre que celle des groupements en position alpha, et elle peut se faire avec les mêmes groupements protecteurs.

Cependant, dans le cas où l'on envisage la prolongation de la chaine peptidique comportant de tels résidus d'acides aminés, soit du côté N-terminal, soit du côté C-terminal, on doit choisir des groupements différents pour protéger les fonctions en position alpha et omega. L'élimination sélective du groupement protégeant par exemple la fonction α-amine, permettra la prolongation de la chaine du côté N-terminal, sans participation du groupement omega-amine, resté protégé pendant ce temps.

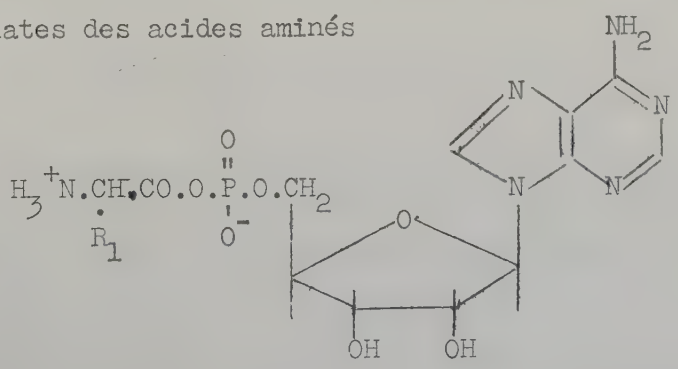
Dans la synthèse d'une chaine peptidique avec la participation d'autres acides aminés trifonctionnels (cystéine, arginine, histidine, sérine, thréonine, tyrosine, méthionine), il est nécessaire, souvent d'une manière impérative, d'effectuer la protection du groupement fonctionnel de la chaine latérale, afin d'éviter des réactions secondaires indésirables. Ces dernières années, des progrès importants ont été

TABLEAU IV

Méthodes de couplage par les anhydrides mixtes

Anhydride mixte avec:	Réactif utilisé	Date	Références
l'ac. chlorhydrique (chlorure d'acide)	PCl_5 ou $SOCl_2$	1902	Fischer et Otto (10)
l'ac. azothydrique (azide)	$R.COOCH_3 \longrightarrow R.CONHNH_2 \longrightarrow R.CON_3$	1902	Curtius (1)
les ac. carboxyliques	C_2H_5COCl	1950	Wieland et Sehring (104)
	$(CH_3)_2CHCH_2COCl$	1951	Vaughan et Osato (105)
l'ac. carbonique alcoylé	C_2H_5OCOCl		Wieland et Bernhard (106)
		1951	Boissonnas (107)
	$(CH_3)_2CHCH_2OCOCl$		Vaughan et Osato (108)
l'ac. sulfurique	$SO_3/HCON(CH_3)_2$	1952	Kenner et coll.(109)
l'ac. phosphoreux substitué	$(C_2H_5O)_2.PCl$	1952	Anderson et coll. (110)
			
			
l'ac. phosphorique substitué	$POCl_3$	1956	Wieland et Heinke (111)

Analogie avec les adénylates des acides aminés



réalisés dans cette voie concernant un certain nombre de ces acides aminés. Nous ne pouvons pas examiner ici tous ces problèmes spéciaux. Néanmoins, dans la 2ème et 3ème PARTIE de cet exposé, nous reviendrons sur la protection des groupements fonctionnels de la chaine latérale dans le cas de trois acides aminés (l'histidine, la lysine et l'acide aspartique) qui font l'objet de nos propres recherches.

Méthodes de couplage.

Examinons maintenant la seconde étape, d'après le schéma général, c'est-à-dire les différentes méthodes utilisées pour la formation de la liaison peptidique.

C'est dans ce domaine que les acquisitions récentes ont apporté le plus grand développement depuis l'époque de Fischer et de Curtius. Ces dix dernières années, une vingtaine de nouvelles méthodes de couplage ont été proposées, et un certain nombre d'entre elles ont trouvé une très large application.

Toutes ces méthodes peuvent se classer en deux catégories, suivant que la réaction utilisée pour effectuer le couplage concerne le carboxyle ou le groupement amine.

Parmi les méthodes qui mettent en oeuvre l'"activation" du carboxyle, on peut distinguer une première catégorie, celle des méthodes qui utilisent comme intermédiaire "riche en énergie" un composé de la forme d'un anhydride. Dans une seconde catégorie de méthodes, le composé intermédiaire utilisé est un ester "activé", c'est-à-dire plus réactif vis-à-vis de l'aminolyse que les esters habituels.

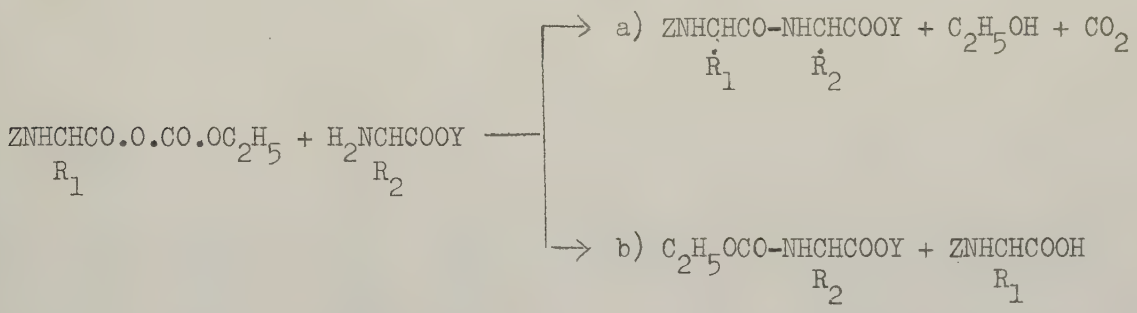
Méthode aux anhydrides mixtes.

Dans le TABLEAU IV, nous avons énuméré les méthodes basées sur l'activation du carboxyle par un anhydride mixte entre ce carboxyle et un autre acide minéral ou

organique, en nous limitant aux procédés qui ont trouvé des applications pratiques dans la synthèse des peptides.

Parmi ces méthodes, on peut classer les anciens procédés : celui des chlorures d'acides aminés qui est rarement appliqué aujourd'hui, et celui des azides qui a subi victorieusement l'épreuve du temps et s'applique de plus en plus pour la jonction des morceaux peptidiques.

De tous ces anhydrides, seuls les anhydrides mixtes avec les alcoylcarbonates ont trouvé une large utilisation. Il faut cependant remarquer que l'emploi de cette dernière méthode, après avoir connu au début une application générale, se trouve aujourd'hui supplantée en partie par d'autres méthodes. L'inconvénient majeur de ce procédé provient de la réaction de dismutation qui peut conduire en principe à la formation de deux produits d'acylation au lieu d'un seul :



La proportion entre a) et b) dépend de la nature des réactifs et des solvants utilisés (112).

Cet inconvénient se fait moins sentir dans la synthèse des dipeptides où l'élimination des produits secondaires est plus aisée que dans celle d'une plus longue chaine peptidique.

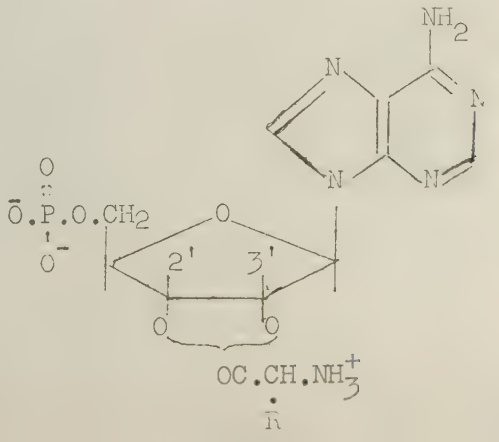
Il est intéressant de signaler que ces anhydrides mixtes, utilisés dans la synthèse chimique de la liaison peptidique, comme dérivés "riches en énergie", présentent une analogie de structure avec les adénylates des acides aminés.

Cette forme d'acides aminés "activés" par la présence d'une liaison "riche en

TABLEAU V

Méthodes de couplage par les esters "actives"

S - e s t e r s			O - e s t e r s		
Dérivé utilisé	Date	Références	Dérivé utilisé	Date	Références
Ester thiophénylique $Z.NH.\underset{\underset{R}{|}}{CH}.CO.SC_6H_5$	1951	Wieland et coll. (114)	Ester cyanométhylique $R.NH.\underset{\underset{R}{|}}{CH}.CO.CH_2.CN$	1955	Schwyzer et coll. (115)
Réactif utilisé: anhydride mixte + thiophénol			Réactif utilisé: $ClCH_2CN$		
Ester p-nitrothiophénylique $Z.NH.\underset{\underset{R}{|}}{CH}.CO.SC_6H_4.NO_2$	1955	Farrington et coll. (120)	Ester p-nitrophénylique $Z.NH.\underset{\underset{R}{|}}{CH}.COOC_6H_4.NO_2$	1955	Bodanszky (116)
Réactif utilisé: $P(SC_6H_4NO_2)_3$		idem	Réactifs utilisés: a) $SO(OC_6H_4NO_2)_2$	1957	Iselin et coll. (117)
			b) $P(OC_6H_4NO_2)_3$		Rothe et Kunitz (118)
			c) $NO_2C_6H_4OH + C_6H_{11}N = C = NC_6H_{11}$		Elliott et Russell (119)
Analogie avec Acyl-CoA $R\ CO\ SCH_2CH_2NH\ CO\ R''$			Analogie avec les acides aminés "activés" (121)		



énergie" entre le carboxyle de l'acide aminé et le résidu de l'acide phosphorique de l'acide adénylique intervient, d'après les récents travaux des biochimistes, dans le processus de la biosynthèse des protéines (113).

Méthode aux esters "activés".

La deuxième catégorie de méthodes de couplage est celle où l'activation du carboxyle se fait par des esters "activés". Ces méthodes, qui sont résumées au TABLEAU V, se sont développées suivant deux tendances indépendantes, l'une s'inspirant de modèles biologiques et l'autre s'appuyant sur les données du mécanisme électronique des réactions. Par la suite, ces deux voies ont convergé vers le même résultat.

La première a eu comme point de départ, la connaissance de la structure du groupement actif du coenzyme A et de son rôle dans le transfert des groupements acyles : WIELAND et coll. (114) ont utilisé le thiophénol pour la synthèse chimique de la liaison peptidique, par analogie avec l'action acylante de l'acetyl-CoA vis-à-vis des amines. Ce thiol, sous la forme d'un composé avec le carboxyle d'un acide aminé - que l'on peut considérer, dans un sens, comme un anhydride - présente les propriétés d'un réactif d'acylation. Ces composés sont relativement stables en milieu aqueux et subissent plus facilement l'aminolyse. Leur préparation se fait par l'action des chlorures ou des anhydrides mixtes des acides aminés sur le thiophénol. Si cette méthode n'a pas trouvé une large application dans la synthèse des peptides, elle a néanmoins ouvert la voie à une nouvelle catégorie de procédés de couplage.

Depuis le temps de Curtius, plusieurs tentatives ont été faites pour obtenir des chaines peptidiques par condensation des esters méthyliques des acides aminés ou des peptides. Mais ces esters se montrent relativement peu réactifs, et des conditions énergiques sont exigées pour une telle condensation.

SCHWYZER et coll. (115) ont entrepris l'étude de l'influence des divers substituants introduits dans la partie alcoyle de l'ester, sur l'action acylante de celui-ci vis-à-vis des amines. Ils ont abouti à la conclusion que l'introduction d'un substituant négatif - le groupement nitrile par exemple - conduit à un dérivé "activé" qui peut jouer le rôle d'un réactif d'acylation dans des conditions relativement douces.

Sur la base de ces constatations, SCHWYZER et coll. ont élaboré la méthode de couplage dite des esters "activés", en préconisant comme réactifs d'acylation les esters cyanométhyliques des acides aminés (115). Ces esters qui se préparent par l'action du chloracétonitrile sur des acides aminés protégés, ont été employés avec succès dans un certain nombre de synthèses peptidiques, mais ils n'ont pas trouvé une large diffusion.

Des réactions secondaires ont été signalées par GOODMAN et STUEBEN (101) pendant l'hydrogénolyse et l'action de HBr/CH_3COOH sur des esters cyanométhyliques des N-carbobenzoxyaminoacides.

De son côté, BODANSZKY (116) a essayé d'interpréter le mécanisme de réaction de la méthode de WIELAND et coll. (114) en mettant l'accent sur le caractère ester des dérivés des acides aminés avec le thiophénol. Il en a apporté la preuve en montrant que les esters phényliques et, encore mieux, les esters p-nitrophényliques réagissent comme des réactifs d'acylation. Cette dernière catégorie d'esters "activés" a surpassé toutes les autres, les p-nitrophénylesters des acides aminés N-acylés permettant la formation de la liaison peptidique dans des conditions très douces et avec un rendement en général très élevé.

Pour que cette méthode de couplage devienne d'une application facile, il restait à trouver des procédés pratiques pour la préparation des dérivés p-nitrophénylés des acides aminés. Ceci a été réalisé par ISELIN et coll. (117) qui obtiennent ces dérivés en faisant agir sur un aminoacide N-acylé, un réactif d'estérification, le

di(p-nitrophényl) sulfite ou le tri(p-nitrophényl) phosphite.

Suivant une deuxième méthode proposée indépendamment par ROTHE (118) et ELLIOTT et RUSSELL (119), on obtient les dérivés p-nitrophénylés en faisant agir la dicyclohexylcarbodiimide sur un mélange d'acide aminé N-acylé et du p-nitrophénol.

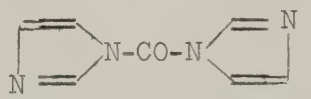
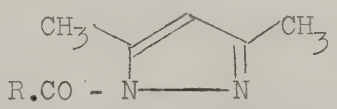
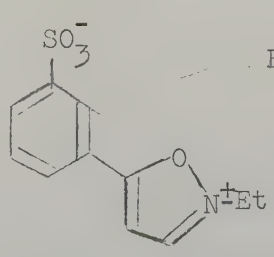
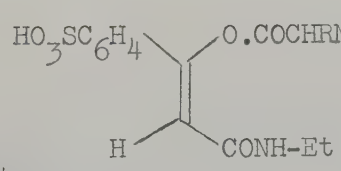
La méthode des p-nitrophényl esters a été employée récemment dans une nouvelle synthèse de l'ocytocine (28c) et de la Lys-vasopressine (35c) avec des résultats excellents.

Avant de quitter les esters activés, mentionnons encore les esters p-nitrothiophényliques (120), qui ont donné l'espoir de simplifier la synthèse des peptides en permettant d'utiliser à la place des esters, les acides aminés libres. Ces esters "activés" sont encore plus actifs que les précédents, le rapport d'activité étant 1 pour l'ester avec le thiophénol, 16 avec le p-nitrophénol et 140 avec le p-nitrothiophénol. Ils résistent à l'hydrolyse et peuvent réagir, à la température ordinaire, avec des solutions aqueuses d'acides aminés ou de peptides tamponnées à pH 6,8 en donnant des peptides avec un très bon rendement. Malheureusement, dans ces conditions, il se produit une racémisation assez importante, ce qui enlève tous les autres avantages de cette méthode. On peut éviter cette racémisation en utilisant, à la place des aminoacides libres, leurs esters : mais, dans ce cas, cette méthode ne présente pas de sérieux avantages par rapport à celle des p-nitrophénylesters (120b). Par contre, le couplage avec les acides aminés non estérifiés peut s'employer sans inconvénient, dans le cas où la racémisation n'intervient pas (p-nitrothiophénylester des résidus glycyl ou prolyl).

Aux esters "activés" utilisés dans la synthèse chimique de la liaison peptidique, il faut rapprocher les acides aminés "activés" qui interviennent dans le processus de la biosynthèse des protéines. Ces derniers diffèrent des adénylates, précemment cités, puisque dans ce cas le carboxyle de l'acide aminé est attaché par une liaison ester sur l'hydrolyse 2' ou 3' du résidu ribose de l'acide adénylique des nucléotides (ARN soluble) (121).

TABLEAU VI

Méthodes de couplage par l'intermédiaire des réactifs "activants"

Méthodes	Réactif utilisé	Date	Références
Carbodiimides	NN'-dicyclohexylcarbodiimide $C_6H_{11}N = C = NC_6H_{11}$	1955	Sheehan et Hess (122) Khorana (123)
Cétène-imines	diphénylcétène-p-tolylimine $(C_6H_5)_2C = C = N.C_6H_4.CH_3$	1958	Stevens et Munk (128)
Cyanamide di-substitué	dibenzyl-cyanamide $(C_6H_5CH_2)_2\ N.C \equiv N$	1960	Losse et Weddige (130)
Ethers d'acétylène	éthoxyacétylène $HC \equiv C.O\ C_2H_5$	1955	Arens (131)
Di-imidazol-carbonyle		1957	Anderson et Paul (132)
Dérivés du 3,5-diméthyl-pyrazole	$R.CONHNH_2 + CH_3COCH_2COCH_3 \rightarrow$ 	1958	Ried et Schleimer (135)
Dérivés de chlorure d'immonium	$(CH_3)_2\ N.CO.H + COCl_2 \rightarrow [(CH_3)_2N = CHCl]^+\ Cl^-$	1960	Zaoral et Arnold (136)
Sels d'isoxazolium (N-ethyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonate (I) Intermédiaire activé: enol ester (II)	 I  II		Woodward et coll. (210) 1961

Méthodes aux réactifs "activants".

La multiplicité des couplages pendant la construction d'une longue chaine peptidique rend grandement désirable la simplification des opérations nécessaires à chacune de ces étapes. Ainsi, plusieurs nouvelles méthodes ont été proposées pour répondre à cette demande : au lieu de preparer, dans une première étape, un dérivé "activé" du partenaire acide que l'on fait ensuite agir sur le partenaire aminé, la réaction de condensation entre les deux partenaires, dans ces nouvelles méthodes, se fait en une seule étape, par l'intermédiaire d'un réactif d'activation.

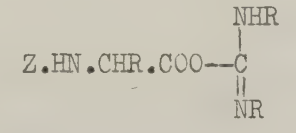
Le mécanisme de l'intervention de ces réactifs, dans la plupart des procédés que nous avons énumérés dans le TABLEAU VI, se ramène à une "activation" du partenaire acide, soit par la formation d'un anhydride symétrique de ce dernier, qui réagit ensuite avec le partenaire aminé (méthode des dérivés acétyléniques, et très probablement, celle des carbodiimides, des cétène-imines et de la cyanamide), soit par l'intermédiaire d'une amide "activée" (méthodes au NN'-carbonyldiimidazole et aux dérivés du pyrazole), soit enfin par un ester activé (méthode à l'isoxazolium).

Parmi ces méthodes, celle de la dicyclohexylcarbodiimide (bis-cyclohexylcarbodiimide) a trouvé une très large application en raison de la simplicité relative des opérations et de la commercialisation du réactif utilisé. Un nombre important de peptides ont été synthétisés par ce procédé durant les années qui ont suivi son introduction dans la synthèse peptidique (122).

L'inconvénient majeur de cette méthode, dû à une réaction secondaire signalée dès le début par KHORANA (123), a été confirmé par la suite à plusieurs reprises. En effet, pendant la formation de la liaison peptidique entre les deux partenaires, ce réactif est transformé normalement en dicyclohexylurée, corps neutre relativement insoluble dans la plupart des solvants habituellement utilisés pour le couplage. Mais l'élimination de la dicyclohexylurée se complique dans certains cas par la for-

mation d'une N-acylurée par condensation du dérivé carboxylique avec le réactif. La quantité plus ou moins importante de ce dérivé parasite abaisse le rendement du couplage et rend souvent difficile l'obtention, à l'état pur, du dérivé peptidique cherché, par simple recristallisation : dans le cas de la jonction des morceaux peptidiques par cette méthode, en raison de la faible différence de solubilité entre la N-acylurée et le dérivé peptidique, seule une distribution à contre-courant permet la séparation de ces deux produits (50b).

Pour expliquer le mécanisme de l'intervention de ce réactif dans la synthèse de la liaison peptidique et préciser les conditions qui favorisent la formation de la N-acylurée, KHORANA (123) a proposé un schéma suivant lequel l'"activation" du carboxyle s'effectue en une première étape par la formation d'un O-ester d'iso-urée.



Ce dérivé "actif" peut réagir, soit avec le partenaire aminé pour donner le dérivé peptidique et la dicyclohexylurée, soit avec un autre résidu amino-acide N-acylé pour conduire à un anhydride symétrique : dans ce cas, c'est ce dernier qui réagira avec le partenaire aminé pour aboutir à la formation du dérivé peptidique. Suivant ce schéma, la N-acylurée est formée par tautomérisation de l'O-ester de l'iso-urée.

D'après un travail plus récent sur les réactions des carbodiimides avec les acides, KHORANA et coll. (124) ont proposé un autre mécanisme pour expliquer la formation de la N-acylurée. Au lieu d'une migration de l'acyle de l'oxygène à l'azote, ils admettent la formation de la N-acylurée comme résultat de l'acylation de l'urée disubstituée initialement formée par l'anhydride symétrique. Cette dernière réaction étant catalysée par des bases et une température élevée, on peut la minimiser en effectuant le couplage à basse température et en contrôlant strictement l'acidité du milieu réactionnel. C'est à ces conclusions qu'aboutissent ZAHN et SCHUSSLER dans

un travail encore inédit[+], en extrapolant le dernier schéma de KHORANA (124).

Les conditions de la formation de l'acylurée pendant la préparation des amides par l'intermédiaire de ce réactif, ont été étudiées très récemment par BUZAS, EGNELL et FREON au Laboratoire de Chimie organique de la Faculté des Sciences à Orsay (126).

La di-cyclohexylcarbodiimide a été utilisée par différents auteurs pour la préparation des adénylates des acides aminés (127a-c) et, très récemment, pour la synthèse des glycopeptides dans lesquels des résidus d'acides aminés sont fixés sur les sucres par une liaison ester (127d). Nous avons mentionné, d'autre part, la préparation des p-nitrophenylesters des acides aminés N-acylés par l'intermédiaire de ce réactif (118, 119), à propos de la méthode aux esters activés.

Le succès de la méthode des carbodiimides dans la synthèse peptidique a orienté les chimistes vers la recherche de réactifs analogues : STEVENS et MUNK ont essayé un analogue azoté du cétène (128) dans la synthèse des peptides [++].

D'autre part, LOSSE et WEDDIGE (130) ont proposé, pour la formation de la liaison peptidique, des dérivés disubstitués de la cyanamide que l'on peut considérer comme forme tautomère des carbodiimides : $N\equiv C.NH_2$ et $HN=C=NH$.

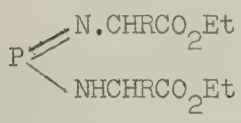
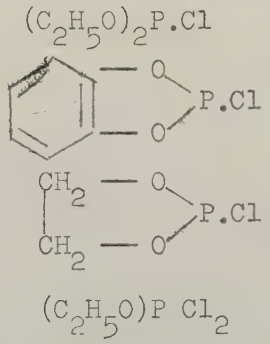
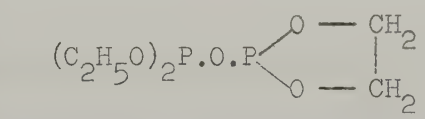
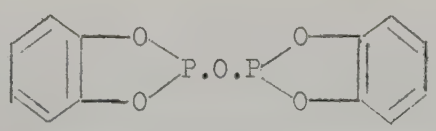
Dans la méthode des ethers acétyléniques, introduite dans la synthèse peptidique par ARENS (131a), l'intermédiaire actif, formé par l'intervention de ces réactifs, est un anhydride symétrique du N-acylaminoacide utilisé (131b). Le couplage, par cette méthode, s'effectue dans l'acétate d'éthyle, et le réactif utilisé, l'éthoxyacétylène (éthoxyéthyne),se transforme à la fin de la réaction en acétate d'éthyle. PANNEMAN, MARX et ARENS (131c) ont récemment utilisé cette méthode pour la synthèse de plusieurs di- et tripeptides ainsi que d'un hexapeptide appartenant à la séquence de la β-corticotropine.

[+] Nous remercions ici le Professeur H. ZAHN et Madame H. SCHUSSLER d'avoir mis à notre disposition le manuscrit de ce travail (125)

[++] Les cétènimides ont été utilisés récemment dans la synthèse des pyrophosphates (129).

TABLEAU VII

Méthodes de couplage par "activation" de la fonction amine

Méthode	Réactif utilisé	Date	Références
Isocyanates ou N-carbonyl-aminoacides esters $O = C = N.CHR.CO_2Et$	$COCl_2/CH_3C_6H_5$	1950	Goldschmidt et Wick (137)
"Phosphorazo" dérivés 	PCl_3/C_6H_5N	1953	Goldschmidt et Lautenschlager (138)
Phosphite-amides $(R'O)_2P.NHCHRCO_2Et$	 $(C_2H_5O)P\,Cl_2$	1953 1956	Anderson et coll (110b, 140)
Ac. polyphosphorique estérifié	$P_2O_5/(C_2H_5O)_2POH$	1958	Schramm et Wissmann (141)
Procédés mixtes (activation du carboxyle et du groupement amine)			
Tétraéthylpyrophosphite	$(C_2H_5O)_2P.O.P(OC_2H_5)_2$	1952	Anderson et coll (64a)
Diéthyléthylènepyrophosphite		1957	Anderson et McGregor (69)
bis(o-phénylène)pyrophosphite		1958	Rydon et coll. (142)

Un autre composé très réactif, le NN'-carbonyldiimidazole, préparé par STAAB (133, 134), a été utilisé récemment avec beaucoup de succès dans la synthèse peptidique par ANDERSON et PAUL (132). D'après ces auteurs, dans une première étape, le NN'-carbonyldiimidazole forme avec l'acide aminé N-protégé un dérivé actif, l'acylimidazole, en même temps qu'il y a dégagement de CO_2 et libération d'un résidu d'imidazole. Dans une deuxième étape, le dérivé actif réagit avec le partenaire aminé pour donner le dérivé peptidique en libérant un second résidu imidazole.

Ce réactif se prépare par action du phosgène sur quatre équivalents d'imidazole. L'application de cette méthode à la synthèse des différents di- et tripeptides, ainsi qu'à celle d'un octapeptide, a été annoncée récemment (44).

Le NN'-carbonyldiimidazole a été utilisé aussi dans le cas de la synthèse d'un cyclopeptide, l'Actinomycine C_3, pour la formation d'une liaison ester (134) entre l'hydroxyle du résidu thréonyl et le carboxyle de la N-methyl-valine en position C-terminale dans la même chaine peptidique (62).

Par analogie avec ce réactif imidazolique, RIED et SCHLEIMER ont proposé pour la synthèse peptidique l'emploi d'un dérivé pyrazolique que l'on obtient en faisant agir un hydrazide d'acide aminé N-acylé sur l'acétylacétone (135). +

Méthode par "activation" de la fonction amine.

Dans une dernière catégorie de méthodes, le couplage est effectué par l'"activation" du groupement amine : TABLEAU VII.

Deux méthodes ont été proposées par GOLDSCHMIDT : celle des dérivés N-carbonylés des aminoacides esters (isocyanates), obtenus par l'action du phosgène sur les esters des acides aminés (137) et celle des dérivés "phosphorazo" formés par l'action du trichlorure de phosphore sur le partenaire aminé dissous dans la pyridine (138). Cette dernière méthode a été plus largement utilisée que la première pour la synthèse de

+ WOODWARD vient d'introduire un réactif activant donnant un rendement élevé, un produit secondaire soluble dans l'eau et une racémisation insignifiante (voir TABLEAU VI)

nombreux peptides (139).

L'activation de la fonction amine est employée aussi dans une série de méthodes proposées par ANDERSON et coll. (110b, 140). Les réactifs utilisés par ces auteurs sont tous des dérivés de l'acide phosphoreux : le diethylchlorophosphite et le dichloroéthylphosphite, l'éthylène chlorophosphite et l'o-phénylène chlorophosphite. Le couplage s'effectue à chaud et de préférence dans un solvant comme le diéthylphosphite. Ce procédé a été utilisé dans différentes synthèses difficiles à réaliser par l'application des méthodes d'activation du groupement carboxyle. Nous aurons l'occasion de revenir sur cette méthode à propos de la synthèse des peptides de l'histidine et de la lysine que nous avons effectuée.

A la place des dérivés de l'acide phosphoreux, SCHRAMM et WISSMANN ont utilisé l'acide polyphosphorique estérifié obtenu par l'action de l'anhydride phosphorique sur le diéthylphosphite (141).

A ces méthodes d'activation de la fonction amine on peut rattacher les procédés dans lesquels ont utilise des dérivés pyrophosphoreux substitués : le tétraethylpyrophosphite (64a), le diéthylèthylènepyrophosphite (69) et le bis-(o-phénylène)-pyrophosphite (142). Avec ces trois réactifs, on peut effectuer l'activation, soit du groupement carboxyle (procédé des anhydrides mixtes), soit du groupement amine (procédé à l'amide), soit enfin la condensation des deux partenaires en une étape (procéde "standard") (64a). La méthode de couplage par le tétraethylpyrophosphite (procédé "standard") a été employée par du VIGNEAUD et coll. pour effectuer la jonction des morceaux peptidiques dans la première synthèse de l'ocytocine (28a).

RYDON et coll. (142b) ont décrit la synthèse de plusieurs tripeptides, en effectuant le couplage par le bis-o-phenylène pyrophosphite (procédé standard) dans la pyridine.

Choix d'une méthode de couplage.

Dans la synthèse d'un peptide, le choix de la méthode de couplage est un problème de première importance.

Trois critères essentiels doivent guider ce choix : le premier concerne le rendement, le second est relatif aux réactions secondaires et à la facilité d'élimination de produits parasites, le troisième enfin se rapporte à la racémisation qui peut intervenir pendant les couplages. Chacun de ces problèmes, très important dans la synthèse d'un dipeptide, devient capital quand il s'agit d'obtenir un polypeptide contenant plusieurs résidus d'acides aminés.

EDMAN, pour montrer l'importance du rendement du couplage dans la synthèse des grands peptides, a calculé le rendement final de la synthèse hypothétique d'un polypeptide de 32 résidus d'acides aminés (143). Dans ce but, il a envisagé deux cas, en supposant l'application répétée de l'une de deux méthodes différentes de couplage, la première donnant un rendement de 80% et la seconde de 40% à chaque opération. Dans le cas le plus favorable - c'est-à-dire lorsque la construction de la chaine peptidique se fait par couplage entre des intermédiaires peptidiques de même taille - la première méthode d'après les calculs d'Edman donnera un rendement final de 33% par rapport à la quantité d'acides aminés utilisés au départ, tandis que la seconde donnera un rendement final de 1%.

Mais, même dans la synthèse des peptides de taille moyenne comme, par exemple, l'ocytocine et la vasopressine, le problème du rendement réellement obtenu prend des aspects presqu'aussi dramatiques que dans les calculs d'Edman : dans l'une des synthèses de l'ocytocine, effectuée en 1959 par BODANSZKY et du VIGNEAUD, après plusieurs améliorations et par l'application de diverses méthodes de couplage (144), le rendement final était inférieur à 5%. Dans la suite, par l'utilisation systématique du couplage par les esters p-nitrophényliques, le rendement a pu monter d'une manière

impressionnante, à 30% dans le cas de l'ocytocine (28c) et à 50% dans le cas de la Lys-vasopressine (35c).

. . . x . x x

Une des difficultés majeures dans la synthèse des peptides est la purification des intermédiaires et l'élimination des produits secondaires. Avec l'augmentation du nombre de résidus d'acides aminés dans une chaine peptidique, les difficultés s'accumulent aussi en ce qui concerne la purification des intermédiaires et du produit final obtenu. Les critères classiques de pureté d'une substance (état cristallin, point de fusion, etc...) ne peuvent pas toujours s'appliquer dans le cas de ces dérivés. D'autre part, souvent l'élimination des produits secondaires ne peut se faire par les méthodes habituelles de purification, et l'obtention d'un produit homogène nécessite, dans ces cas, des opérations laborieuses de purification par distribution à contre-courant et par chromatographie de partage. La synthèse de plusieurs peptides naturels, effectuée ces dernières années, n'aurait pu aboutir sans le concours de ces divers procédés de contrôle de l'homogénéité des produits obtenus et d'élimination des produits secondaires (50b).

La racémisation pendant la synthèse peptidique.

Le critère le plus important pour évaluer les résultats d'une synthèse peptidique avec des acides aminés optiquement actifs, concerne l'homogénéité stéréochimique du produit obtenu : l'emploi des différents groupements de protection temporaire, le choix de la méthode de couplage ainsi que la voie à adopter pour la construction de la chaine peptidique doivent être décidés en dernière analyse sur la base de ce critère.

En effet, le risque d'une racémisation, qui peut se produire pendant la forma-

tion de la liaison peptidique par les différentes méthodes que nous avons énumérées, constitue une véritable "pierre d'achoppement", surtout dans le cas de la synthèse des peptides naturels physiologiquement actifs.

Pour cette raison, le problème de la racémisation est spécialement étudié ces dernières années. Pour obtenir des indications sur l'intervention éventuelle d'une racémisation pendant le couplage, plusieurs procédés ont été utilisés.

Les premiers essais de la méthode des anhydrides mixtes aux alcoylcarbonates (106-108) (voir TABLEAU IV) ont montré que la configuration stéréochimique est retenue inchangée pendant le couplage de carbobenzoxyaminoacides avec des esters ou des sels de sodium des acides aminés. Mais, par la suite, VAUGHAN (145) constate une racémisation plus ou moins importante pendant les couplages, effectués par cette méthode, entre les dérivés N-Cbz-Glycyl-L-phénylalanine et N-Cbz-Glycyl-L-leucine d'une part, et glycine ester d'autre part (synthèse par N-acyl-peptides).

Si, par contre, le même dérivé, Cbz-Glycyl-L-phénylalanyl-glycine ester, est synthétisé par couplage de la Cbz-Glycine avec le L-phénylalanyl-glycine ester (synthèse par N-acylaminoacides), aucune racémisation ne se produit.

Le pourcentage de racémisation dans la synthèse par N-acyl-peptides dépend,pour une grande part, de la nature du solvant utilisé, le tétrahydrofuranne donnant une racémisation minime et le chloroforme une racémisation complète.

Ces résultats, confirmés par d'autres auteurs (146, 147), en ce qui concerne la méthode des anhydrides mixtes aux alcoylcarbonates, ont été corroborés par l'examen d'autres méthodes de couplage soumises à l'épreuve, suivant des procédés divers.

Parmi ces tests, la synthèse des dérivés Cbz-glycyl-L-phénylalanyl-glycine ethylester et Cbz-glycyl-L-leucyl-glycine methylester, par couplage des N-acyl peptides, a été utilisée comme modèle pour le contrôle des différentes méthodes, en raison de la commodité de séparation du dérivé racémique de son isomère actif par simple recristallisation, dans des conditions déterminées. Ainsi, ANDERSON et coll. ont examiné

la méthode au tétraethylpyrophosphite (64a) (voir TABLEAU VII), les différents procédés aux phosphite-amides (110, 140) (TABLEAU IV et VII) et plus récemment les méthodes aux carbodiimides (148) et au NN'-carbonyldiimidazole (44) (TABLEAU VI). De même, SCHRAMM et WISSMANN (141), pour la méthode à l'ester polyphosphorique (TABLEAU VII) et ARENS (131c) (TABLEAU VI) pour la méthode aux ethers acétyléniques, (TABLEAU VI.), ont utilisé le procédé de Vaughan.

La synthèse d'un dérivé tétrapeptidique a été préconisée comme modèle par CLAYTON et coll. (109b), pour contrôler la racémisation pendant les couplages par la méthode aux anhydrides mixtes de l'acide sulfurique (109b) (TABLEAU IV), et par celle aux esters p-nitrothiophényliques (120b) (TABLEAU V). Ces auteurs effectuent le couplage de la Cbz-glycyl-L-alanine avec la L-phénylalanyl-glycine et soumettent le tétrapeptide obtenu à une distribution à contre-courant dans un mélange de solvants appropriés pour séparer les diastéréoisomères éventuellement formés.

GRASSMANN et WUNSCH (139b), pour contrôler la méthode aux dérivés "phosphorazo" (TABLEAU VII), ont synthétisé le dérivé Cbz-glycyl-L-phénylalanyl-L-alanine par couplage de la Cbz-glycyl-L-phénylalanine avec le L-alanine ester et ont examiné son homogénéité optique en le soumettant à l'action de la carboxypeptidase pancréatique. La méthode enzymatique a été utilisée aussi par HOFMANN (50b) et par SCHWARZ et BUMPUS (147), pour l'examen de l'homogénéité optique des peptides obtenus par la méthode des carbodiimides.

De l'ensemble de ces études effectuées avec des acides aminés et des peptides N-carbobenzoxylés, se dégage la conclusion suivante : bien que les N-carbobenzoxy-aminoacides ne se racémisent pas habituellement pendant leur couplage avec des aminoacides esters, par les différentes méthodes que nous avons énumérées précédemment, les N-carbobenzoxy-dipeptides (ou polypeptides) peuvent subir une racémisation plus ou moins étendue s'ils sont couplés avec des aminoacides ou peptides esters par une de ces méthodes, à l'exception de celle aux azides. Cette racémisation intervient

aussi dans le cas où l'on effectue le couplage d'un carbobenzoxy-dipeptide avec un aminoacide ester par l'activation de la fonction amine. Dans ce dernier cas, comme dans les précédents, la racémisation concerne toujours, et uniquement, le résidu de l'acide aminé auquel appartient le carboxyle libre (ou "activé").

Il est bien connu, d'autre part, que les acides aminés optiquement actifs, acylés par le groupement carbobenzoxy ou par certains autres groupements analogues, résistent à la racémisation pendant divers traitements (action des alcalis, de l'anhydride acétique etc... (149a).

Par contre, ces acides aminés, acylés par un groupement benzoyl, acétyl, trifluoracétyl, etc..., subissent facilement une racémisation par les mêmes traitements.

Se basant sur cette différence, YOUNG et coll. (149, 150) ont entrepris l'examen systématique des diverses méthodes de couplage, par un procédé différent des précédents qui consiste à effectuer la synthèse du dérivé N-acétyl-L-leucyl-glycine methyl ester par l'application de ces méthodes à et comparer le degré de racémisation observé dans chaque cas. D'après les résultats de cette épreuve, particulièrement sensible pour déceler l'intervention d'une racémisation, toutes les méthodes actuelles de couplage, à la seule exception de la vieille méthode de CURTIUS, aux azides, provoquent, dans ces conditions, la racémisation du résidu L-leucine à des degrés différents.

Cette racémisation, très étendue avec la méthode des anhydrides mixtes aux alcoylcarbonates et avec celle des dérivés "phosphorazo", est beaucoup moins importante avec les carbodiimides. Elle est largement favorisée par l'emploi d'un chlorhydrate d'aminoacide ester et d'un équivalent de base tertiaire à la place de l'ester libre.

Ces résultats ne signifient pas que les méthodes qui provoquent une racémisation, dans cette synthèse, donnent obligatoirement des résultats pareils dans des synthèses avec des acides aminés protégés par d'autres groupements, mais ils attirent l'attention sur un danger de racémisation qui, potentiellement, existe. Par ailleurs ils mettent en évidence le rôle important du groupement utilisé pour la protection

temporaire de la fonction amine des acides aminés et donnent, dans une certaine mesure, une évaluation des différentes méthodes de couplage, en ce qui concerne la racémisation. De cette épreuve, c'est le groupement carbobenzoxy et la méthode des azides qui sortent avec les meilleures qualifications.

La construction d'une chaine peptidique.

Sur la base de ces constatations, on peut maintenant envisager la construction d'une chaine peptidique par étapes, suivant les trois voies théoriquement possibles que nous avons énumérées au début de cet exposé.

Il est évident que si l'on envisage la construction de la chaine en ajoutant au bout C-terminal un résidu d'acide aminé à chaque étape, on risque de provoquer à chacune de ces étapes une racémisation du résidu de l'acide aminé auquel appartient le carboxyle "activé" lors du couplage. Le seul moyen de préserver sûrement la configuration stéréochimique consiste à utiliser exclusivement la méthode des azides. Ce procédé a été employé récemment par ZAHN et LA FRANCE (157) pour la synthèse d'un tétrapeptide de la chaine B de l'insuline. Mais une telle restriction dans le choix des méthodes de couplage n'est pas acceptable dans tous les cas.

Si, par contre, on envisage la construction de la chaine en effectuant les couplages successifs du côté N-terminal (synthèse par voie récurrente), en ajoutant chaque fois un aminoacide protégé, on ne risque pas l'intervention d'une racémisation. Les seules conditions obligatoires sont alors l'addition, à chaque étape, d'un seul acide aminé protégé et l'emploi, pour la protection de la fonction amine, de groupements qui ne favorisent pas la racémisation. Dans ce cas, on peut utiliser pratiquement toutes les méthodes de couplage énumérées précédemment.

Bien que cette deuxième voie soit la moins rentable du point de vue quantitatif, et qu'elle soit beaucoup plus laborieuse que la première, elle est de plus en plus adoptée pour la synthèse des peptides optiquement actifs, parce qu'elle présente les

meilleures garanties vis-à-vis du danger de racémisation, tout en laissant une grande liberté dans le choix des méthodes. L'adoption de cette voie, non seulement pour la synthèse de tri- et de tétrapeptides, mais aussi pour la construction de chaines plus longues, est devenue possible grâce à l'introduction de méthodes donnant un rendement très élevé pendant le couplage. C'est ainsi que BODANSZKY et du VIGNEAUD ont pu effectuer la synthèse de l'ocytocine et de la Lys.-vasopressine par voie récurrente (28c, 144).

L'emploi de ce procédé présente l'inconvénient de nécessiter l'élimination sélective du groupement protecteur de la fonction amine, à chaque étape, tout en conservant la protection des fonctions de la chaine latérale éventuellement présentes.

D'autre part, la construction d'une très longue chaine peptidique, même avec des méthodes d'un rendement très élevé, ne peut pas toujours se réaliser suivant la voie récurrente. Dans ce cas, après l'obtention des fragments peptidiques, plus ou moins longs, synthétisés de préférence par la voie récurrente, on procède à leur jonction, soit de préférence par la méthode des azides - sans aucun risque de racémisation - soit par l'une de ces méthodes qui permettent, sous contrôle strict des conditions de couplage, de minimiser le danger de racémisation. C'est cette troisième voie qui a été utilisée le plus fréquemment dans la synthèse des divers peptides naturels.

La présence de la glycine ou de la proline dans la séquence du peptide dont la synthèse est envisagée, constitue un cas particulièrement favorable. En effet, la glycine n'a pas de carbone asymétrique et la proline résiste à la racémisation dans les conditions habituelles de couplage. La synthèse de fragments peptidiques avec ces acides aminés en position C-terminale permet d'envisager ensuite leur jonction, sans risque de racémisation. Cette condition favorable s'est présentée dans la synthèse partielle de l'ACTH, effectuée par SCHWYZER et coll., par jonction de trois fragments peptidiques de 10, 4 et 5 résidus d'acides aminés, dont les deux premiers avaient la glycine comme acide aminé C-terminal et le troisième la proline (54).

Ainsi, par l'application de groupements de protection adéquats et de méthodes de couplage variées, adaptées aux particularités de chaque cas, se construit, étape par étape, une longue chaine peptidique.

Les nouvelles voies de la synthèse peptidique.

La conservation de la configuration stéréochimique pendant la jonction des morceaux peptidiques par la méthode des azides, a donné une place de choix à cette méthode de couplage et a rendu particulièrement intéressants les divers procédés qui étaient proposés pour écarter certains de ses inconvénients et élargir le champ de son application.

La technique classique de préparation des hydrazides d'acides aminés ou de peptides, par traitement des esters méthyliques correspondants avec un grand excès d'hydrazine, n'est pas compatible avec l'emploi des groupements phtalyle et trifluoracétyle pour la protection de la fonction amine : le premier subit l'hydrazinolyse dans ces conditions et le second est éliminé par ce réactif alcalin.

D'autre part, le traitement de certains N-carbobenzoxy-peptides esters, par un réactif aussi alcalin que l'hydrazine, ne peut se faire sans réactions secondaires.

Pour toutes ces raisons, un procédé indirect d'introduction de la fonction hydrazide, protégée temporairement (proposé il y a une dizaine d'années par HOFMANN et coll. (102)),a trouvé récemment des applications nouvelles (103, 151, 152, 61b, 46b). Dans ce but, trois dérivés de l'hydrazine ont été utilisés : la carbobenzoxyhydrazine $C_6H_5CH_2OCONHNH_2$ (102), la tritylhydrazine $(C_6H_5)_3C.NHNH_2$ (103) et la t-butyloxycarbonylhydrazine (t-butyloarbazate) $(CH_3)_3C.OCO.NHNH_2$ (61b, 46b).

En couplant ces dérivés avec un acide aminé, N-acylé par un groupement de protection temporaire adéquat, on obtient des dérivés de structure

$$Z_1\text{-NH.CHR'CO-NHNH-}Z_2$$

Par élimination sélective du groupement protecteur de la fonction amine (Z_1), on obtient un dérivé d'acide aminé H_2N-CHR'CONHNH-Z_2, qui peut servir sous cette forme pour un nouveau couplage avec un autre acide aminé N-acylé, en donnant le dipeptide protégé :

$$Z_1\text{-NH.CHR''CO-NH.CHR'CONHNH-}Z_2$$

En éliminant maintenant, d'une manière sélective, le groupement Z_2 (qui protège la fonction hydrazide) on peut transformer l'hydrazide, ainsi libéré, en azide et effectuer un nouveau couplage du côté C-terminal cette fois, sans danger de racémisation et sans les inconvénients du traitement avec l'hydrazine. Les diverses combinaisons des groupements de protection temporaire qui ont été utilisés pour ce dérivé bi-fonctionnel de formule générale

$$Z_1\text{-}(\ \text{NHCHR''CO-NHCHR'CO}\ )_n\text{-NHNH-}Z_2$$

sont énumérées dans le tableau suivant :

Groupement protecteur de la fonction amine Z_1	Groupement protecteur de la fonction hydrazide Z_2	Références
Pht [+]	Cbz [+]	Hofmann et coll. (102)
Tos	Cbz	idem
TFA	Tri	Weygand et coll. (103)
Cbz	Tri	Hegedüs (151)
Cbz	BOC	Schwyzer (152, 61b) Boissonnas et coll.(46b)
PZ	BOC	Schwyzer et coll.(61b)

[+] Pour les abréviations, voir le tableau II

Ainsi, par ce procédé ingénieux, la portée de la méthode des azides s'est élargie davantage. ISELIN et SCHWYZER ont étendu son application aux N-trityl-peptides (153) et aux N-t-BOC peptides (154).

Mais l'application de la méthode des azides n'est pas sans inconvénients. Ces réactions secondaires, soit par transformation des azides en isocyanates (réaction de Curtius), dans le cas de la valine (155), soit par migration de l'azide de la position γ en position α dans le cas de l'acide glutamique (156) ont été signalées. Dans la troisième partie de ce travail, nous reviendrons sur une autre réaction secondaire que nous avons eu l'occasion de constater pendant la préparation des peptides de la lysine, par la méthode des azides.

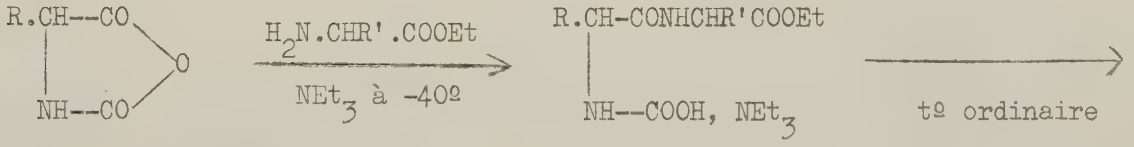
x x x

Des méthodes de couplage par l'intermédiaire d'un dérivé bifonctionnel, appartenant à d'autres catégories de composés que celui utilisé dans la méthode des hydrazides protégés, se sont développées ces dernières années. Ces procédés - qui s'écartent du schéma classique adopté couramment - constituent des exemples d'application de nouvelles voies visant à écourter et à simplifier les étapes consécutives dans la synthèse des polypeptides. Ainsi, la synthèse des tripeptides, par une seule opération et sans isolement des produits intermédiaires, a été réalisée avec succès par l'emploi, comme dérivés bifonctionnels, des anhydrides de N-carboxy-α-aminoacides ou 2,5-oxazolidinediones (anhydrides de Leuchs).

Ces dérivés sont utilisés couramment pour la préparation des polymères peptidiques des acides α-aminés (les poly α-aminoacides de KATCHALSKI (158)). BAILEY (159) a montré, il y a dix ans, qu'on peut minimiser la tendance à la polymérisation de ces dérivés en stabilisant l'acide carbamique, formé comme intermédiaire, par salification avec une base tertiaire à basse température (-60º à -75º) : tandis que les

anhydrides des N-carboxy-α-aminoacides se polymérisent déjà à la température de 0º, à -60º la vitesse de polymérisation devient beaucoup moins importante par rapport à la vitesse d'aminolyse de ce dérivé très actif.

En mélangeant, à cette température et en milieu strictement anhydre, des quantités équivalentes d'anhydride d'un N-carboxy-α-aminoacide, d'un ester d'un autre acide aminé (ou peptide) et d'une base tertiaire, on obtient le carbamate correspondant ; quand on laisse monter la température, le carbamate se décompose en CO_2 et en peptide ester :



$$R.CH(NH_2)-CO-NH.CHR'.COOEt + CO_2 + NEt_3$$

Cette méthode a été appliquée dans plusieurs cas par RUDINGER et coll. (160) pour préparer des tripeptides en une seule opération. En faisant agir le chlorure d'un N-tosyl aminoacide sur le dipeptide ester, obtenu par réaction de l'anhydride d'un N-carboxy-α-aminoacide avec l'ester d'un acide aminé, et sans isolement préalable du produit de cette réaction, ces auteurs ont préparé des tripeptides protégés avec un rendement satisfaisant et sans racémisation.

Un autre procédé d'utilisation des dérivés bifonctionnels, pouvant servir pour des couplages consécutifs, a été proposé récemment par GOODMAN et STUEBEN (101). Ces auteurs ont utilisé la différence de vitesse de formation de la liaison peptidique par la méthode aux carbodiimides (5 heures) et par celle aux esters "activés" (12 à 24 heures). Le dérivé bifonctionnel employé dans ce procédé est le bromhydrate d'un aminoacide p-nitrophényl ester, obtenu par scission du groupement N-carbobenzoxy du dérivé correspondant. En effectuant un premier couplage du dérivé bifonctionnel avec

un N-acyl-aminoacide, par la méthode des carbodiimides, on obtient un dérivé dipeptidique, protégé et "activé" à la fois, qui, sans isolement préalable, est utilisé directement pour un second couplage avec un autre aminoacide ester, par la méthode des esters "activés" suivant le schéma :

$$Z.NH.CHR'.COOH + HBr,\ H_2N.CHR".COOC_6H_4NO_2 \xrightarrow{\text{1er couplage}}$$

$$Z.NH.CHR'.CO\text{-}NH.CHR".COOC_6H_4NO_2 + NH_2CHR"'.COOEt \xrightarrow{\text{2ème couplage}}$$

$$Z.NH.CHR'.CO\text{-}NH.CHR"CO\text{-}NH.CHR"'.COOEt$$

D'après les résultats de GOODMAN et STUEBEN, la synthèse, par ce procédé, du tripeptide-modèle Cbz-glycyl-L-phenylalanyl-glycine ethyl ester, proposé par VAUGHAN, n'a pas révélé de racémisation (101).

Cependant, très récemment, divers auteurs ont attiré l'attention sur la racémisation qui intervient, soit pendant la préparation de p-nitrophényl esters de N-carbobenzoxy dipeptides (161, 162), soit pendant la conservation des N-carbobenzoxy aminoacides p-nitrophényl esters, en présence de petites quantités de triéthylamine (163).

Il faut signaler aussi que le procédé des dérivés bifonctionnels aux esters p-nitrophényliques était employé précédemment par SCHWYZER et SIEBER pour effectuer la cyclisation du décapeptide à chaine ouverte, correspondant à la structure de la Gramicidine S (60). Ces auteurs ont utilisé le groupement trityle pour la protection temporaire de la fonction amine du décapeptide à chaine ouverte ; ils ont activé ensuite le carboxyle de ce décapeptide en le transformant en ester p-nitrophénylique et ont procédé à l'élimination sélective du groupement N-trityle par l'action à froid d'une solution aqueuse d'acide trifluoracétique. La cyclisation du dérivé bi-fonctionnel ainsi obtenu était éffectuée par addition de pyridine.

C o n c l u s i o n

Dans la PREMIERE PARTIE de notre exposé, nous avons essayé de donner une vue d'ensemble sur les développements récents[+] dans les méthodes de la synthèse peptidique, développements dont la connaissance se révèle indispensable si l'on se propose de résoudre les problèmes particuliers d'une synthèse déterminée.

L'essentiel de ces acquisitions se résume dans les conclusions suivantes :

1) La voie habituelle de synthèse des peptides par la protection temporaire des groupements fonctionnels reste encore aujourd'hui la méthode la plus généralement employée, bien que des essais aient été faits pour utiliser des procédés qui s'écartent de ce modèle.

2) Pour la protection de la fonction amine, parallèlement au carbobenzoxy classique, plusieurs nouveaux groupements sont maintenant utilisés. Aucun de ces groupements, malgré les avantages que peut donner leur utilisation dans certains cas, n'a supplanté le carbobenzoxy qui continue à avoir la plus large application. La multiplicité de ces groupements, et la variété des moyens employés pour obtenir leur élimination sélective, sans toucher à la protection des autres groupements fonctionnels, ont élargi considérablement les possibilités de synthèse des peptides de composition complexe.

3) Les nouveaux moyens proposés pour la protection de la fonction carboxyle ont tous la caractéristique d'écarter l'emploi de l'hydrolyse alcaline pour leur

---

[+] L'examen de la bibliographie concernant cette partie s'arrête à Janvier 1961

C o n c l u s i o n

Dans la PREMIERE PARTIE de notre exposé, nous avons essayé de donner une vue d'ensemble sur les développements récents[+] dans les méthodes de la synthèse peptidique, développements dont la connaissance se révèle indispensable si l'on se propose de résoudre les problèmes particuliers d'une synthèse déterminée.

L'essentiel de ces acquisitions se résume dans les conclusions suivantes :

1) La voie habituelle de synthèse des peptides par la protection temporaire des groupements fonctionnels reste encore aujourd'hui la méthode la plus généralement employée, bien que des essais aient été faits pour utiliser des procédés qui s'écartent de ce modèle.

2) Pour la protection de la fonction amine, parallèlement au carbobenzoxy classique, plusieurs nouveaux groupements sont maintenant utilisés. Aucun de ces groupements, malgré les avantages que peut donner leur utilisation dans certains cas, n'a supplanté le carbobenzoxy qui continue à avoir la plus large application. La multiplicité de ces groupements, et la variété des moyens employés pour obtenir leur élimination sélective, sans toucher à la protection des autres groupements fonctionnels, ont élargi considérablement les possibilités de synthèse des peptides de composition complexe.

3) Les nouveaux moyens proposés pour la protection de la fonction carboxyle ont tous la caractéristique d'écarter l'emploi de l'hydrolyse alcaline pour leur

---

[+] L'examen de la bibliographie concernant cette partie s'arrête à Janvier 1961

siologiquement actifs, sont la synthèse récurrente à partir du bout C-terminal, et la jonction de morceaux peptidiques par des méthodes de couplage qui donnent, dans certaines conditions, le minimum de racémisation. Dans ce deuxième cas, le dérivé racémique formé en petite quantité peut, éventuellement, s'éliminer par purification du produit final.

6) Dans la construction de morceaux peptidiques ou d'une chaine entière, par voie récurrente, la protection temporaire de la fonction α-amine et celle des groupements fonctionnels de la chaine latérale des acides aminés trifonctionnels, doivent se faire par des groupements qui peuvent s'éliminer indépendamment les uns des autres. Ainsi, il est possible de prolonger la chaine du côté N-terminal, tout en conservant la protection des groupements fonctionnels de la chaine latérale.

Le présent travail s'attache spécialement à ce dernier problème.

Notre contribution à ce sujet concerne la synthèse, par voie récurrente, d'histidyl-peptides (DEUXIEME PARTIE) et d'α-Lysyl-peptides (TROISIEME PARTIE), par l'intermédiaire de dérivés protégés par des groupements différents sur la fonction α-amine et sur la chaine latérale : fonction imine du noyau imidazolique de l'histidine et fonction ε-amine de la lysine.

D E U X I E M E P A R T I E

SYNTHESE DES HISTIDYL-PEPTIDES PAR DES INTERMEDIAIRES PROTEGES SUR LE NOYAU IMIDAZOLIQUE

APPLICATION A LA SYNTHESE D'UN DERIVE TETRAPEPTIDIQUE CORRESPONDANT A LA SEQUENCE C-TERMINALE D'UNE ANGIOTENSINE

I n t r o d u c t i o n

Le rôle particulier des résidus histidine des chaines peptidiques dans les systèmes biologiques est dû à la présence du noyau imidazole dans la chaine latérale de cet acide aminé. Les propriétés chimiques et biochimiques qui en résultent[+] ont suscité, parmi les biochimistes, un vif intérêt pour la synthèse chimique des peptides de l'histidine.

L'obtention des peptides comportant cet acide aminé en position N-terminale se heurte à plusieurs difficultés : celles-ci proviennent de la réactivité du noyau imidazole vis-à-vis des réactifs acylants (165, 166), et de l'insolubilité relative des dérivés N-acylés de l'histidine, ayant le noyau imidazole non protégé, dans les solvants organiques habituellement utilisés pour les couplages.

Déjà, en 1928, BERGMANN et ZERVAS (167) et plus récemment WIELAND et SCHNEIDER (168) ont montré que des groupements acyle, fixés sur l'azote imidazolique sont transférés sur des fonctions α-amine dans des conditions très douces. Cette propriété acylante de tels dérivés du noyau imidazolique a été utilisée par ANDERSON et coll. (169) pour augmenter le rendement du couplage par le tétraethylpyrophosphite en l'effectuant en présence d'imidazole. La récente méthode de couplage qui utilise comme intermédiaire le NN'-carbonyldiimidazole (voir Page 18 et TABLEAU VI) est aussi basée

[+] examinées dans une récente revue d'ensemble par BARNARD et STEIN (164)

sur cette réactivité du noyau imidazolique (32).

Les réactions secondaires auxquelles peut conduire cette réactivité du noyau imidazolique pendant la synthèse des N-histidyl-peptides ont été plus ou moins écartées par l'utilisation du couplage par la méthode des azides. Mais, pour que cette méthode puisse être appliquée à la synthèse de ces peptides il fallait prendre en considération le caractère basique de l'azote imidazolique de l'histidine N^{α}-acylée et adapter, en conséquence, le procédé classique utilisé pour ce couplage. Ceci a été fait par HOLLEY et SONDHEIMER (170), FISCHER et WHETSTONE (171), DAVIS (172) et MERRIFIELD et WOOLLEY(57).

Ainsi, par l'application de cette méthode, a été effectuée la synthèse d'un certain nombre de peptides de l'histidine, sans protection temporaire du noyau imidazolique (40, 43 à 45, 57, 173-177). Quatre autres méthodes ont été également utilisées pour effectuer le couplage des dérivés N^{α}-acylés de l'histidine, non protégés sur leur noyau imidazolique : la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide par SCHWYZER et coll. (43b) et par OKAWA (59, 178), la méthode au diéthylchlorophosphite par SCHWARTZ et coll. (42), la méthode aux dérivés "phosphorazo" par HELFERICH et BOSHAGEN (179) et enfin la méthode au NN'-carbonyldiimidazole par PAUL et ANDERSON (44). Parmi les peptides ainsi obtenus, un certain nombre appartiennent aux peptides naturels biologiquement actifs (angiotensines et strépogénines).

Le fait que, dans ces synthèses, on ait utilisé des dérivés de l'histidine à noyau imidazolique non protégé s'explique en grande partie par la carence en méthodes commodes et efficaces pour protéger temporairement le noyau imidazolique par des groupements protecteurs pouvant être éliminés sans difficultés à la fin de la synthèse. Dans la plupart de ces synthèses, des purifications laborieuses par distribution à contre-courant étaient nécessaires pour éliminer les produits secondaires. Dans l'un de ces cas, par exemple, le produit final obtenu, examiné par chromatographie sur papier avant sa purification par distribution à contre-courant, montrait

trois taches distinctes, positives au réactif de Pauly (42), ce qui indique la présence des trois dérivés contenant de l'histidine. L'intérêt de l'élimination de ces divers inconvénients, surtout dans le cas de la synthèse de longues chaines peptidiques, justifie la recherche de nouvelles méthodes de synthèse des histidyl-peptides, avec protection temporaire du noyau imidazolique.

En effet, ces dernières années, des dérivés de l'histidine, dont la fonction amine et le noyau imidazolique sont tous les deux protégés, ont été utilisés dans ce but. Pour protéger le noyau imidazolique, trois groupements chimiques différents ont été proposés : le benzyle (180), le trityle (181, 76, 77b, 182) et le carbobenzoxy (181, 183, 184). Le dérivé N^{α}, N^{im}-dicarbobenzoxy histidine présente l'avantage, par rapport au dérivé N^{α}-carbobenzoxy histidine, d'être soluble dans la plupart des solvants organiques. Il a été utilisé par AKABORI et coll. (184) pour la synthèse des histidyl-peptides par la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide. Mais l'instabilité du groupement N^{im}-carbobenzoxy en milieu acide ou alcalin semble limiter l'utilisation de ce dérivé aux synthèses dans lesquelles les couplages sont effectués du côté C-terminal par rapport au résidu histidine. En effet, d'après les récentes constatations d'ELLIOTT et MORRIS (185), la scission complète du groupement N^{im}-carbobenzoxy par les acides faibles, et sa scission partielle par les acides forts (HBr/CH_3COOH), ne permet pas d'envisager l'élimination sélective du groupement N^{α}-carbobenzoxy sans scission du groupement N^{im}-carbobenzoxy, pour effectuer ensuite la prolongation de la chaine peptidique du côté N-terminal, dans les mêmes conditions que du côté C-terminal.

Le dérivé N^{α}, N^{im}-dityrityl-L-histidine a trouvé aussi quelques applications : AMIARD et coll. (182) l'ont utilisé pour la synthèse de deux dipeptides, et BOISSONNAS et coll. pour l'obtention d'un pentadécapeptide avec l'histidine en position N-terminale, au cours de la synthèse d'un eicosapeptide correspondant à la séquence N-terminale de l'ACTH (53), et pour celle d'un octapeptide amide, dans la

synthèse de l'α-mélanotropine (186, 49). Le couplage de ce dérivé était effectué par la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide dans le chlorure de méthylène ou dans la diméthylformamide. Cependant, dans ces syntheses comme dans celles d'AKABORI, la protection du noyau imidazolique était utilisée dans la mesure où la prolongation de la chaine peptidique s'effectuait du côté C-terminal, c'est-à-dire sans élimination du groupement protecteur de la fonction amine. Dès qu'on avait affaire à la prolongation de la chaine peptidique du côté N-terminal par rapport à l'histidine protégée, on était conduit à éliminer à la fois le groupement protecteur de la fonction amine et celui de la fonction imine. ZERVAS et coll. (77b, 181) ont décrit l'obtention d'un dérivé de l'histidine dont seul le noyau imidazolique est protégé par le groupement tritryle. Ce dérivé, obtenu par détritylation sélective à partir du dérivé ditritylé, est sensible aux acides et, à notre connaissance, n'a pas été utilisé dans la synthèse peptidique.

En 1937, du VIGNEAUD et BEHRENS (180) ont préparé le dérivé N^{im}-benzyl-L-histidine pour protéger la fonction imine et obtenir la méthylation sélective de la fonction amine. Ces auteurs ont montré que le groupement N^{im}-benzyle, relativement très stable envers les acides et les bases, était éliminé facilement par réduction par le sodium métallique dans l'ammoniac liquide (180). Mais c'est beaucoup plus tard seulement que ce dérivé sera utilisé pour la synthèse des peptides de l'histidine. LEITNER (187), travaillant au Laboratoire de BOISSONNAS, prépare l'ester méthylique de la N^{im}-bzy-histidine et utilise ce dérivé pour effectuer le couplage avec la Cbz-glycine par la méthode des anhydrides mixtes au chlorocarbonate d'éthyle. Avec le peptide N-Cbz-glycyl-N^{im}-bzy-histidine comme modèle, cet auteur a étudié l'action des divers réactifs de scission des groupements protecteurs et a montré que HBr/CH_3COOH pouvait scinder sélectivement le groupement N^{α}-carbobenzoxy sans que le groupement N^{im}-benzyle soit touché.

THEODOROPOULOS (188), indépendamment de LEITNER, a utilisé également l'ester méthylique de la N^{im}-bzy-L-histidine dans la synthèse, par la méthode des anhydrides mixtes aux alcoyl-carbonates, des divers peptides avec l'histidine en position C-terminale.

Objet du travail, choix des dérivés et des méthodes de couplage.

Essais préliminaires

Parallèlement à ces deux derniers travaux, nous avons commencé, à la même période, la synthèse des peptides de l'histidine par l'intermédiaire des dérivés protégés sur leurs fonctions amine et imine, dans le but d'appliquer nos résultats à l'obtention d'une chaine peptidique de structure correspondant à la séquence C-terminale de l'angiotensine Val^5II +.

Dans l'une des premières synthèses de l'angiotensine $Ileu^5II$ +, effectuée par SCHWARZ, BUMPUS et PAGE (42), des morceaux peptidiques ont été couplés par une série de jonctions que l'on peut représenter par la formule :

$$2_{1-2} + \left[(2_{3-4} + 2_{5-6})_{3-6} + 2_{7-8} \right]_{3-8}$$

Mais les résultats obtenus n'étaient pas très encourageants.

Ainsi, en commençant la synthèse du tétrapeptide C-terminal de l'angiotensine Val^5II, nous avons décidé d'appliquer la voie récurrente, pour être à l'abri de toute

+ Pour désigner les diverses angiotonines = hypertensines, BRAUN-MENENDEZ et PAGE (200) ont proposé le nom hybride angiotensine. D'après la notation introduite par SCHWYZER et coll. (40), on désigne par angiotensine Val^5I le décapeptide isolé à partir du serum de boeuf et caractérisé par la présence de la Valine en position 5 à partir de l'extrémité N-terminale. Angiotensine Val^5II désigne l'octapeptide correspondant à l'angiotensine Val^5I, après ablation du dipeptide C-terminal, et angiotensine $Ileu^5II$ l'octapeptide analogue au précédent, caractérisé par la présence de l'isoleucine à la place de la valine en position 5 et provenant du serum de cheval.

racémisation, et d'effectuer, en plus la protection du noyau imidazolique pour écarter les réactions secondaires dûes à la présence de ce dernier.

Deux ans après leur première publication, alors que notre travail était déjà avancé, SCHWARZ et BUMPUS (147) ont décrit la synthèse d'un tétrapeptide appartenant à la séquence N-terminale de cette angiotensine, par la méthode aux anhydrides mixtes et par celle aux carbodiimides, en utilisant les trois voies possibles pour son obtention et en comparant la pureté optique des produits synthétisés. Les résultats de ce travail minutieux ont montré que la synthèse par voie récurrente préserve l'homogénéité optique et que dans les deux autres voies intervient une racémisation plus ou moins importante.

Afin de pouvoir appliquer la synthèse par voie récurrente, il nous fallait disposer d'une méthode qui nous permette d'introduire dans une chaine peptidique, en position N-terminale, l'histidine protégée, et de pouvoir ensuite allonger cette chaine du côté N-terminal, tout en conservant la protection du noyau imidazolique. Dans ce but on devait utiliser des dérivés de l'histidine protégés par des groupements différents sur le noyau imidazolique et sur la fonction amine, de sorte qu'il soit possible de libérer la fonction amine sans toucher au groupement fixé sur la fonction imine du noyau imidazolique, cette dernière restant ainsi protégée pour les étapes ultérieures de la synthèse.

Le groupement N^{im}-benzyl, beaucoup plus résistant à l'acidolyse que les groupements N^{im}-carbobenzoxy et N^{im}-trityle, était seul à répondre à ces exigences.

Parmi les groupements qui servent à protéger la fonction amine, et qui peuvent être éliminés beaucoup plus facilement que le N^{im}-benzyle, nous avons choisi les groupements qui s'éliminent par acidolyse : le trityle et le carbobenzoxy.

Les essais préliminaires de préparation du dérivé N^{α}-trityl-N^{im}-benzyl-L-histidine, soit par tritylation directe de la N^{im}-bzy-L-histidine suivant la méthode de ZERVAS et coll. (77), soit par saponification de l'ester méthylique de la N^{α}-trityl-

N^{im}-bzy-L-histidine, nous ont donné des résultats très peu satisfaisants du point de vue rendement et pureté des produits. Malgré la bonne solubilité de ce dérivé dans les solvants organiques, nous n'avons pas poursuivi son obtention à l'échelle préparative à cause de ces difficultés.

Par contre, nous avons effectué la préparation de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine avec des résultats très satisfaisants [+].

Indépendamment de nous, divers auteurs ont décrit la préparation de ce dérivé, avec des résultats analogues (188, 190, 191) [++].

La N^{im}-bzy-L-histidine que nous avons utilisée pour l'obtention de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine a été préparée suivant la methode de du VIGNEAUD et BEHRENS (180), c'est-à-dire par traitement d'une solution de dichlorhydrate monohydrate de L-histidine dans l'ammoniac liquide, par le sodium métallique et addition du chlorure de benzyle. Cependant, le produit pur que nous avons préparé à plusieurs reprises possédait constamment un pouvoir rotatoire de valeur pratiquement égale à la moitié de celle donnée par ces auteurs, dans les mêmes conditions expérimentales.

Il en était de même pour le dérivé énantiomorphe que nous avons préparé à partir de la D-histidine. Le dérivé N^{α}-bzy-N^{im}_{bzy}-L-histidine qu'on obtient comme produit secondaire pendant cette préparation, possédait aussi un pouvoir rotatoire de valeur pratiquement égale à la moitié de celle indiquée par ces auteurs.

D'autre part, le pouvoir rotatoire de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine, ainsi que

---

[+] SCHWYZER et LI (189) ont rapporté dans une communication préliminaire, l'utilisation d'un nouveau dérivé de la N^{im}-bzy-histidine, la N^{α} (N' méthoxyphenylazobenzyloxy)-N^{im}-benzyl-L-histidine, sans décrire sa préparation ni la méthode de couplage utilisée.

[++] La N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine a été utilisée par KATCHALSKI et coll. (192) pour la préparation de la poly-L-histidine par polymérisation du N-carboxyanhydride de la N^{im}-bzy-L-histidine et élimination du groupement N^{im}-benzyle par Na dans NH_3 liquide.

celui des dérivés N^{α}-cbz-N^{im}-L-histidyl-glycine et L-histidyl-glycine que nous avons obtenu à partir de cette préparation de la N^{im}-bzy-L-histidine, est en accord avec les données de la littérature (191, 174).

Nous avons soumis le dérivé N^{im}-benzyl-L-histidine à l'hydrogénation catalytique et nous avons mesuré le pouvoir rotatoire de l'histidine ainsi obtenue, isolée sous forme de chlorhydrate : sa valeur était pratiquement celle donnée dans la littérature. Ainsi, l'intervention d'une racémisation partielle pendant la préparation de ce dérivé était exclue.

Cependant, plusieurs auteurs qui ont utilisé la N^{im}-bzy-L-histidine, préparée suivant la méthode de du VIGNEAUD et BEHRENS, n'ont rien signalé dans leurs publications concernant le pouvoir rotatoire de ce dérivé (187, 188, 190, 191, 192, 195, 196, 201).

Après la publication des résultats de notre travail (193), nous avons eu la confirmation de nos constatations concernant le pouvoir rotatoire de ce dérivé par le Professeur V. du Vigneaud et par Dr. O. Behrens qui ont réexaminé ce problème dans leur laboratoire (194).

Le dérivé N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-histidine, malgré le blocage des fonctions amine et imine, grâce à la basicité de son azote "pyridinique" et à l'acidité de son carboxyle se comporte comme un ion amphotère avec un point isoélectrique aux environs de pH 6, comme les essais d'électrophorèse sur papier nous l'ont montré.

La faible solubilité dans les solvants organiques, conséquence de cette structure, était un des facteurs qui conditionnait le choix de la méthode de couplage. Pour décider de ce choix, nous avons fait des essais avec quatre méthodes différentes : 1) anhydrides mixtes aux alcoylcarbonates 2) dicyclohexylcarbodiimide 3) dérivé "phosphorazo" et 4) phosphite-amide, par l'intermédiaire de l'o-phénylène-chlorophosphite.

Les deux premières réalisent le couplage par l'"activation" du carboxyle du

dérivé acylé de l'histidine et les deux dernières pæ l'"activation" du groupement amine du second partenaire.

Les essais préliminaires, pour appliquer la première méthode dans le couplage de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine avec l'ester méthylique de la L-prolyl-L-phénylalanine, n'ont pas donné de résultats satisfaisants. L'utilisation du chlorocarbonate d'éthyle et du chlorocarbonate d'isobutyle en présence de triethylamine, de tétrahydrofuranne, de dioxanne ou de dimethylformamide, a conduit à des produits fortement colorés et à des rendements très faibles. Pour ces raisons nous n'avons pas poursuivi les essais dans cette voie. WINTERSTEIN et coll. (191) ont également signalé des résultats négatifs dans l'application de cette méthode au couplage du dérivé N-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine avec l'hydrazide de l'acide isonicotinique, dans des conditions qui ont permis, sans difficultés, le couplage de ce dernier dérivé avec d'autres N-acylaminoacides.

Nos essais préliminaires pour utiliser la méthode aux carbodiimides n'ont pas conduit non plus à des résultats satisfaisants : le couplage de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine (qu'on a pu dissoudre, en chauffant, dans un volume relativement important de diméthylformamide) avec l'ester méthylique de la L-prolyl-L-phénylalanine, a conduit à la formation du dérivé peptidique, avec un rendement très médiocre, accompagné d'un dérivé secondaire (la N-acylurée correspondante) en quantité importante.

Indépendamment de notre travail, THEODOROPOULOS et FOLSCH (195) ont décrit la synthèse des histidyl-peptides par la méthode des carbodiimides. Il faut cependant signaler que la mauvaise solubilité de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine dans la diméthylformamide à froid, a obligé ces auteurs à effectuer le couplage de ce dérivé à 40º-45º. Mais, le couplage par les carbodiimides dans ces conditions peut conduire à la formation de produits secondaires et risque de provoquer la racémisation des N-acyl-peptides (148). Dans un procédé modifié (148b) le couplage a été effectué à la température ordinaire.

Dans ces essais préliminaires, nous avons constaté que la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histi-

dine est soluble dans la pyridine à chaud et très soluble dans le diéthylphosphite qui est un excellent solvant pour des peptides difficilement solubles dans les solvants organiques habituels. Ainsi, notre choix était dirigé vers les méthodes dans lesquelles le couplage s'effectue par chauffage dans ces solvants par le procédé de l'activation du groupement α-amine du deuxième partenaire (voir TABLEAU VII).

Nous avons essayé d'abord le couplage de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine avec l'ester éthylique de la glycine et l'ester méthylique de la L-leucine, par le trichlorure de phosphore dans la pyridine, suivant la méthode de GOLDSCHMIDT et LAUTENSCHLAGER (138) et la technique utilisée par GRASSMANN et WUNSCH (139b). Nous avons obtenu des résultats plus ou moins satisfaisants, mais pas toujours constants. Nous décrivons, dans la partie expérimentale, l'obtention de l'ester méthylique de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-leucine par l'application de cette méthode [+].

Cependant, les couplages qui nous ont constamment donné les meilleurs résultats, ont été effectués suivant le procédé au phosphite amide avec l'o-phénylène chlorophosphite comme réactif d'"activation" du groupement amine du deuxième partenaire.

Cette méthode de couplage, comme celle à l'éthylène chlorophosphite, a trouvé quelques applications sporadiques dans les récentes synthèses des peptides naturels (197) et aussi pour effectuer des couplages difficiles à réaliser par les méthodes habituelles (198).

La préparation de l'o-phénylène chlorophosphite étant plus facile que celle de l'éthylènechlorophosphite (198), nous avons préparé le premier de ces deux réactifs

---

[+] Dans le résumé des communications présentées au 2ème Symposium Européen sur la Synthèse des Peptides, à Munich, est rapportée la synthèse, par WUNSCH (41), des peptides de l'histidine de la séquence de l'Angiotensine Val^5I, par la méthode au trichlorure de phosphore et par le dérivé N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine ; mais la publication détaillée de ce travail n'a pas encore paru.

et nous l'avons utilisé pour les essais préliminaires, avec des résultats très encourageants.

C'est avec cette méthode que, finalement, nous avons effectué les couplages de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine, aussi bien pour obtenir des dipeptides avec les esters méthylique et éthylique de la glycine que pour préparer le tripepta protégé N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine méthylester [+].

Une fois la N^{α}-cbz-N^{im}-L-histidine introduite dans la chaine peptidique, l'allongement de celle-ci du côté N-terminal a été effectué, après scission sélective du groupement N^{α}-carbobenzoxy par une solution d'acide bromhydrique dans l'acide acétique. Ce procédé a laissé intact le groupement benzyle fixé sur la fonction imine du noyau imidazolique.

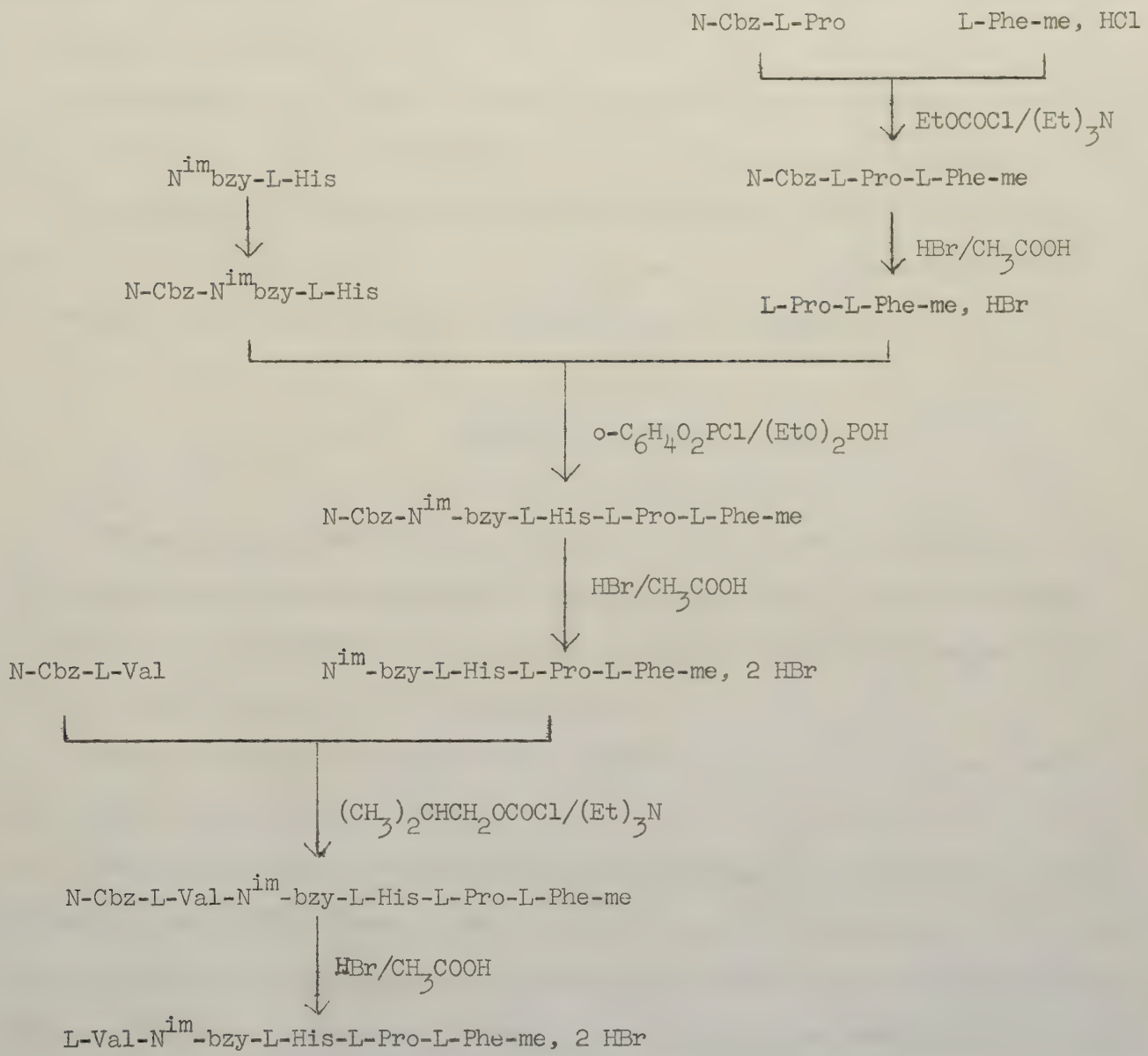
En ce qui concerne le comportement du groupement N^{im}-benzyle pendant l'hydrogénation catalytique, les opinions de différents auteurs qui ont utilisé ce dérivé étaient partagées : LEITNER (187), JONES (199) et SCHWYZER (189) relatent une résistance de ce groupement pendant l'hydrogénation catalytique à la pression atmosphérique et à température ordinaire, en présence soit d'oxyde de palladium ou de platine, soit de palladium sur charbon, tandis que THEODOROPOULOS (188, 195) décrit à plusieurs reprises une débenzylation complète par hydrogénation catalytique prolongée. Nos propres essais d'hydrogénation catalytique des dérivés N^{im}-bzy-L-histidine, N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-glycine et N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-leucine ont montré que la vitesse d'hydrogénolyse de ce groupement en présence de noir de palladium fraichement préparé, est extrêmement lente à la température ordinaire. A une température plus élevée (50º C), la débenzylation devient plus rapide, mais elle est accompagnée

---

[+] La même méthode nous a aussi donné des résultats satisfaisants pour le couplage de la N^{α}-cbz-N^{ε}-tosyl-L-lysine avec l'ester benzylique de la L-isoleucyl-valine (voir TROISIEME PARTIE)

SCHEMA II

Synthèse du tétrapeptide C-terminal de l'angiotensine Val^5 II.



de réactions secondaires. L'utilisation d'un catalyseur plus actif, comme certaines préparations de palladium sur charbon, nous a cependant permis d'effectuer l'hydrogénolyse de ces dérivés à la température ordinaire, en prolongeant la durée de l'hydrogénation catalytique.

Cet ensemble de résultats nous permet de conclure que l'on dispose, pour la première fois, d'une méthode de synthèse des histidyl-peptides par l'intermédiaire des dérivés protégés différemment sur leurs fonctions amine et imine, de telle sorte qu'il est possible d'appliquer la voie récurrente pour la formation d'une chaine peptidique, avec la participation de ces dérivés de l'histidine.

Résultats obtenus

Pour appliquer cette méthode, nous avons choisi la séquence C-terminale L-Val-L-His-L-Pro-L-Phe correspondant à l'angiotensine Val^5 II [+], dont la synthèse a été réalisée par SCHWYZER et coll. (43a), selon des méthodes différentes de la nôtre, et sans protection du noyau imidazolique.

Nous avons effectué la synthèse de ce tétrapeptide par voie récurrente suivant les étapes indiquées dans le SCHEMA II.

L'ester méthylique de la N-cbz-L-prolyl-L-phénylalanine, qui constitue la première étape de cette synthèse, a été obtenu par nous pour la première fois à l'état cristallisé sous forme de longues aiguilles fines, tandis que dans deux autres synthèses, effectuées récemment par SCHWARZ et coll. (42) et par SCHWYZER et coll. (43a), ce dérivé est décrit sous forme d'huile. Nous avons ainsi enregistré son point de fusion et son pouvoir rotatoire.

[+] voir note de la page 39.

L'ester méthylique de la L-prolyl-L-phénylalanine a été obtenu à l'état cristallisé sous forme de bromhydrate, par l'action de HBr/CH_3COOH sur le dérivé précédent. Ce composé était décrit dans la littérature (42, 43a) sous la forme du chlorhydrate obtenu par hydrogénation catalytique du dérivé huileux précédent. Le pouvoir rotatoire de notre produit, calculé pour la base libre, avait pratiquement la même valeur que celui des deux autres préparations décrites dans la littérature.

L'ester méthylique de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine, dont la préparation constitue l'étape la plus importante de cette synthèse, a été obtenu avec un bon rendement, et à l'état cristallisé, par la méthode de couplage à l'o-phénylène chlorophosphite dans le diéthylphosphite.

Dans un travail paru après la publication de nos propres résultats (193), THEODOROPOULOS et coll. (201) ont rapporté la synthèse du même dérivé par la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide, mais le produit obtenu est décrit sous forme d'une huile.

Le bromhydrate de l'ester méthylique de la N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine a été obtenu à l'état cristallisé par scission sélective du groupement N^{α}-carbobenzoxy par HBr/CH_3COOH du dérivé précédent.

A partir de ce dérivé, la prolongation de la chaine peptidique du côté N-terminal peut s'effectuer sans difficultés particulières, par l'application des méthodes habituelles de couplage.

Ainsi, par la méthode des anhydrides mixtes au chlorocarbonate d'isobutyle, dans le tétrahydrofuranne, nous avons obtenu, avec un bon rendement, l'ester méthylique de la N-cbz-L-valyl-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine à l'état cristallisé. L'ester méthylique de la N-cbz-L-isoleucyl-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine préparé très récemment par THEORODOPOULOS et coll. (201) est décrit sous forme d'une huile.

De nouveau, par scission sélective du groupement N-carbobenzoxy du dérivé pré-

cédent, par HBr/CH_3COOH, nous avons obtenu le dibromhydrate de l'ester méthylique de la L-valyl-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine sous forme d'un produit cristallisé, mais très hygroscopique.

Ce dernier dérivé peut servir éventuellement à l'obtention de l'angiotensine Val^5II, par sa jonction, par exemple, avec le dérivé tétrapeptidique adequat correspondant à la partie N-terminale de cet octapeptide. Mais ceci dépassait le cadre du programme que nous nous sommes fixé et qui se limitait ici à la synthèse des histidyl-peptides.

Dans la partie expérimentale, nous décrivons trois autres couplages de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine dont les deux premiers, effectués par l'o-phénylène chlorophosphite, étaient faits avec le glycinate d'éthyle et le glycinate de méthyle, et le troisième, effectué par le trichlorure de phosphore, avec le leucinate de méthyle.

Par saponification de l'ester éthylique de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-glycine et après hydrogénation catalytique du dérivé obtenu, nous avons isolé le peptide L-histidyl-glycine sous la forme de son chlorhydrate, à l'échelle préparative. Ce dipeptide était préparé précédemment par PHOTAKI et coll. (174) suivant la méthode des azides et sans protection du noyau imidazolique. Le point de fusion et le pouvoir rotatoire de notre produit étaient en accord avec les valeurs données par ces auteurs. Signalons que DAVIS (172) a décrit ce dipeptide avec un point de fusion nettement plus élevé et un pouvoir rotatoire tout à fait différent.

Pour effectuer la synthèse de ces peptides, nous avons préparé les dérivés suivants :

1) N-carbobenzoxy-L-valine (cristallisé)

2) N-carbobenzoxy-L-proline (huile cristallisée après ensemencement avec des cristaux de ce produit, aimablement fournis par le Dr. B. Iselin)

3) N^{α}-carbobenzoxy-L-histidine méthylester (huile)

4) N^{α}-carbobenzoxy-L-histidine hydrazide (cristallisé)

5) N^{α}-carbobenzoxy-L-histidine azide (huile)

6) N^{im}-benzyl-L-histidine et 7) N^{im}-benzyl-D-histidine (cristallisés)

8) N^{α}-benzyl-N^{im}-benzyl-L-histidine (cristallisé)

9) Chlorhydrate du L-phénylalaninate de méthyle (cristallisé)

10) Chlorhydrate du L-leucinate de méthyle (cristallisé)

11) Dichlorhydrate du L-histidinate de méthyle (cristallisé)

12) Dichlorhydrate du N^{im}-bzy-L-histidinate de méthyle (solide déliquescent)

13) Chlorhydrate de glycine méthylester (cristallisé)

14) Chlorhydrate de glycine éthylester (cristallisé)

Tous ces dérivés obtenus par des méthodes et avec des caractéristiques indiquées dans la littérature ne sont pas décrits dans la Partie Expérimentale, où nous avons donné seulement les références bibliographiques de la méthode utilisée pour leur préparation, à l'exception des dérivés 6, 7 et 8 pour lesquels nous apportons de nouvelles valeurs du pouvoir rotatoire, rectifiant celles données dans la littérature (180) (voir p. 41).

Pour la préparation des esters 9 à 12, nous avons utilisé la méthode au chlorure de thionyle de BRENNER et HUBER (202) que nous décrivons dans la Troisième Partie de ce travail. Elle nous a donné en général de meilleurs résultats que le procédé classique de FISCHER au gaz chlorhydrique sec (203).

Pour disposer des substances de référence pour la chromatographie sur papier, nous avons préparé l'anhydride de l'histidine (dicetopiperazine) par condensation de deux molécules d'ester méthylique de l'histidine, et le chlorhydrate de l'histidyl-L-leucine (cristallisé) obtenu par couplage de l'azide de la N^{α}-cbz-L-histidine avec l'ester méthylique de la L-leucine, suivant HOLLEY et SONDHEIMER (170), saponification de l'ester méthylique de la N-cbz-L-histidyl-L-leucine (cristallisé) et hydrogénation catalytique de la N-cbz-L-histidyl-L-leucine (cristallisé).

Pendant la préparation des divers dérivés que nous avons utilisés au cours de ces

synthèses, pour contrôler la pureté des produits et avoir des renseignements sur la marche des réactions, nous avons systématiquement eu recours à la chromatographie sur papier. Nous avons pu utiliser cette technique même dans le cas des dérivés de l'histidine protégés sur les fonctions amine et imine qui ne réagissent ni avec la ninhydrine, ni avec les réactifs de diazotation, grâce à l'emploi de la méthode à l'iode (204), pour révéler les taches correspondant à ces dérivés de l'histidine. Cette réaction, qui n'est pas spécifique des dérivés de l'histidine (l'ester méthylique de la N-cbz-prolyl-phénylalanine réagit aussi avec ce réactif), est beaucoup plus facile à appliquer que la méthode au chlore (205, 206). Son utilisation pour le contrôle de la pureté de ces dérivés de l'histidine nous a permis d'obtenir rapidement des renseignements utiles, et d'améliorer les préparations dans un certain nombre de cas.

Dans le TABLEAU VII, nous avons enregistré les valeurs de RF, dans quatre mélanges de solvants différents, d'une trentaine de dérivés.

Au cours de ce travail, nous avons été amené à préparer certains réactifs nécessaires à la synthèse des peptides. A l'époque où nous avons commencé nos synthèses, ces réactifs ne se trouvaient dans le commerce ni en France, ni à l'étranger. Ainsi, avons-nous effectué la synthèse de l'o-phénylène-chlorophosphite (o-phénylènephosphorochloridite des auteurs anglosaxons), la NN'dicyclohexyl carbodiimide, le chlorocarbonate de sec. butyle, le chlorocarbonate d'isobutyle et le chlorure de benzyloxycarbonyle ou chlorure de carbobenzoxy (benzyl chloroformate des auteurs anglosaxons, Chlorkohlensäurebenzylester ou Chlorameisensäurebenzylester des auteurs germaniques). La préparation de ces réactifs, à l'exception du dernier, était effectuée suivant des méthodes décrites dans la littérature. Certains de ces réactifs ont été commercialisés récemment et sont devenus facilement accessibles sur le marché chimique étranger. Pour la préparation de ces réactifs, nous ne donnerons dans la Partie Expérimentale que quelques commentaires. Nous décrirons par contre, avec plus de détails, la technique que nous avons mise au point pour la préparation, à l'échelle du laboratoire,

du chlorure de carbobenzoxy, le réactif le plus largement utilisé dans la synthèse peptidique. Nous l'avons préparé en faisant agir, à basse température, de l'alcool benzylique sur du phosgène liquide, sans solvant. Le produit, obtenu avec un rendement excellent, est incolore et se conserve pendant plus d'un an à la glacière sans se colorer, tandis que dans les mêmes conditions, le produit préparé suivant la méthode décrite dans ORGANIC SYNTHESES (207) avec une solution toluénique de phosgène se colore en brun en quelques semaines.

Madame CLAUDE NICOT a partagé avec nous beaucoup de peine dans ce travail. Sa collaboration nous a été constamment précieuse et bien souvent indispensable. Je tiens à lui exprimer ici ma gratitude pour l'aide qu'elle a offerte généreusement.
Qu'il me soit aussi permis de dire ma reconnaissance à mon camarade FERNAND KIEFFER pour la courageuse offre de collaboration pendant l'opération dangereuse et délicate de liquéfaction du phosgène et de sa mise en réserve dans une série d'ampoules scellées.

Résumé de la Deuxième Partie

I. La synthèse des peptides de l'histidine, comportant cet acide aminé en position N-terminale, se heurte à plusieurs difficultés qui proviennent de la réactivité du noyau imidazolique. Dans la synthèse de longues chaines peptidiques avec la participation de cet acide aminé, ces inconvénients sont particulièrement gênants et la protection temporaire de la fonction imine de ce noyau devient nécessaire.

Les méthodes déjà utilisées pour ce but (emploi de dérivés disubstitués de l'histidine avec le même groupement de protection temporaire, comme la N^{α}-cbz-N^{im}-cbz-histidine et la N^{α}-tri-N^{im}-tri-histidine) ne peuvent servir pour la protection du noyau imidazolique que dans le cas de synthèses de dipeptides, et de la prolongation de la chaine du côté C-terminal uniquement. Cette voie de construction d'une chaine peptidique, qui ne garantit la conservation de la configuration stéréochimique des résidus des acides aminés incorporés que dans des conditions bien limitées, ne convient pas à toutes les synthèses peptidiques. Pour ces raisons nous avons cherché à élaborer une nouvelle méthode de synthèse des histidyl-peptides qui élimine ces inconvénients.

2. Le but de ce travail était donc, d'une part, d'obtenir des histidyl-peptides en écartant pendant leur synthèse les réactions secondaires auxquelles peut participer le noyau imidazolique et, d'autre part, d'éviter la racémisation pendant la construction d'une chaine peptidique après l'incorporation d'un résidu histidine, en utilisant à cette fin la voie récurrente.

Pour atteindre le premier objectif, nous avons employé des dérivés de l'histidine protégés, non seulement sur leur fonction amine, mais aussi sur la fonction imine du noyau imidazolique. Afin de pouvoir prolonger la chaine peptidique du côté N-terminal (synthèse par voie récurrente), nous avons choisi des groupements différents

pour la protection de ces deux fonctions, de sorte qu'il est possible de libérer la fonction amine sans toucher au groupement fixé sur la fonction imine. Ainsi, la protection du noyau imidazolique reste assurée pendant les couplages consécutifs effectués sur le bout N-terminal.

3. Pour protéger temporairement la fonction α-amine, nous avons choisi le groupement carbobenzoxy, et pour bloquer la fonction imine, le groupement benzyle. C'est ainsi que nous avons préparé le dérivé N^{α}-carbobenzoxy-N^{im}-benzyl-L-histidine qui a servi pour les couplages avec des esters d'acides aminés et de peptides. La N^{im}-benzyl-L-histidine, le produit de départ pour toutes ces synthèses, ainsi que son antipode optique, préparées selon du VIGNEAUD et BEHRENS (180), présentaient une valeur de pouvoir rotatoire égale à la moitié environ de celle donnée par ces auteurs. Nous avons prouvé l'homogénéité de nos produits et l'absence d'une racémisation partielle. Nos résultats concernant le pouvoir rotatoire de ce composé ont été confirmés récemment par ces auteurs.

4. Nous avons effectué les couplages de l'histidine ainsi protégée en "activant" la fonction α-amine du deuxième partenaire par la méthode à l'o-phénylène chlorophosphite et en utilisant comme solvant le diéthylphosphite. L'"activation" du carboxyle de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine par les anhydrides mixtes aux alcoylcarbonates conduit à la formation de produits colorés et ne convient pas à ce couplage.

5. Sur des peptides ainsi obtenus, nous avons éliminé le groupement N^{α}-carbobenzoxy par acidolyse avec HBr/CH_3COOH, sans que le groupement N^{im}-benzyle soit touché. L'élimination de ces deux groupements de protection temporaire, par hydrogénolyse au palladium sur charbon, a été effectuée dans le cas de dipeptides, en prolongeant suffisamment l'hydrogénation catalytique et en utilisant des préparations de catalyseur très actives.

6. La méthode que nous avons élaborée pour la synthèse des dipeptides a été

appliquée ensuite à la préparation, par voie récurrente, d'un dérivé du tétrapeptide de la séquence C-terminale de l'angiotensine, le bromhydrate de l'ester méthylique de la L-valyl-N^{im}-benzyl-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine qui, sous cette forme, peut éventuellement servir à l'obtention de l'octapeptide correspondant à l'angiotensine. Cette synthèse, effectuée suivant le SCHÉMA II(page 46 bis), a montré qu'après l'introduction du dérivé de l'histidine protégé sur son noyau imidazolique, la prolongation de la chaine du côté N-terminal pouvait s'effectuer par les méthodes habituelles de couplage, et notamment par les anhydrides mixtes, sans difficultés spéciales.

7. Nous avons obtenu à l'état cristallisé tous les dérivés intermédiaires de cette synthèse et nous les avons caractérisés par leur point de fusion, le pouvoir rotatoire, la valeur R_F dans plusieurs solvants et leur analyse élementaire. Parmi ces dérivés, un certain nombre ont été préparés pour la première fois, et d'autres qui étaient décrits dans la littérature sous forme d'huile ont été obtenus à l'état cristallisé.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'on dispose ainsi d'une méthode de synthèse des histidyl-peptides, par l'intermédiaire des dérivés protégés sur leurs fonctions amine et imine, permettant l'utilisation de la voie récurrente pour la synthèse d'une chaine peptidique.

TROISIEME PARTIE

SYNTHESE D'α-LYSYL-PEPTIDES DE LA SEQUENCE N-TERMINALE DU TRYPSINOGENE

Introduction

La structure des α-lysyl-peptides, dont nous avons entrepris la synthèse, se rapporte à une partie de la séquence N-terminale de la chaine peptidique du trypsinogène qui, d'après les connaissances actuelles, est la suivante :

Val. Asp. Asp. Asp. Asp. Lys. Ileu. Val. Gly....etc.
1 2 3 4 5 6 7 8 9

Ce choix a été motivé par les circonstances suivantes : en 1954, à la demande de Monsieur le Professeur P. DESNUELLE, nous avons effectué la synthèse du dipeptide acide L-valyl-L-aspartique. Ce peptide a servi de "modèle" et a permis à P. DESNUELLE et C. FABRE-GABELOTEAU (211) de déterminer le nombre de résidus d'acide aspartique - qui n'étaient pas encore précisé à cette époque - appartenant à la séquence N-terminale du trypsinogène. Par la suite, les progrès réalisés dans l'étude de l'aspect structural de la transformation de ce zymogène en enzyme actif, nous ont amené à changer d'orientation dans notre travail qui, au début, était axé sur la synthèse des aspartyl-peptides, en vue de préciser la nature de leur liaison α ou β existant dans le peptide naturel. Les synthèses que nous avons entreprises ultérieurement concernaient la préparation de substrats de la trypsine, destinés à servir de "modèles" pour une étude ultérieure de certains aspects de la spécificité de cet enzyme, mis en évidence par les recherches des équipes de DESNUELLE et de NEURATH sur la transformation de la structure primaire pendant l'activation autocatalytique du trypsinogène (214, 215).

La spécificité de cet enzyme, établie à l'aide de substrats peptidiques simples obtenus par synthèse (21, 212), ainsi que par l'étude de l'hydrolyse des chaines peptidiques naturelles (213) est bien définie : l'action de cette endopeptidase sur une chaine peptidique concerne uniquement les liaisons peptidiques auxquelles participent, d'une part, la L-lysine ou la L-arginine par leur carboxyle et, d'autre part, les divers acides α-aminés (à l'exception des iminoacides proline et hydroxyproline) par leur fonction α-amine, les groupements ε-amine et guanidinique étant libres, bien entendu.

Dans la chaine peptidique du trypsinogène qui contient 14 résidus lysine et 2 résidus arginine, existent en principe plusieurs liaisons susceptibles d'être hydrolysées par la trypsine. Cependant, dans l'activation du trypsinogène par la trypsine, en présence d'ions calcium, au lieu d'une protéolyse étendue, on constate une protéolyse limitée (214a), localisée à la sixième liaison peptidique à partir du bout N-terminal du trypsinogène, celle de la liaison ... lysyl-isoleucyl... Cette hydrolyse se manifeste par la libération de l'hexapeptide Val.$(Asp)_4$.Lys qui appartient à la séquence N-terminale du trypsinogène (216,215).

Pour expliquer cette action localisée de la trypsine, on invoque la structure secondaire et tertiaire de la chaine peptidique du trypsinogène. On peut néanmoins se demander si la structure primaire particulière autour de la liaison Lys-Ileu ne confère pas à cette liaison de "position stratégique" un caractère spécial qui la rend particulièrement vulnérable à la trypsine.

Les constatations de DESNUELLE et GABELOTEAU (217) sur le rôle des ions calcium pendant l'activation du trypsinogène par la trypsine ont permis de préciser que cette action se manifeste par une accélaration notable de l'hydrolyse de la liaison Lys-Ileu et la suppression quasi-totale de certaines autres hydrolyses observées en absence de calcium. Mais ces résultats ne permettaient pas de déduire si cette action est liée à des modifications de la structure secondaire ou tertiaire de la chaine

peptidique ou si elle se rapporte à la structure de la séquence N-terminale de celle-ci.

A ce sujet, NEURATH et coll. (218) ont apporté des arguments en faveur d'une action locale des ions calcium. En effet, ces auteurs ont modifié la structure tertiaire et secondaire du trypsinogène en effectuant la rupture des liaisons disulfure dans des conditions qui ne provoquent ni la scission des liaisons peptidiques ni la destruction de certains acides aminés. L'action de la trypsine sur ce trypsinogène modifié a permis de constater que la présence des ions calcium avait pour effet la libération de l'hexapeptide $Val(Asp)_4Lys$ à un pourcentage, par rapport au trypsinogène présent, beaucoup plus élevé qu'en absence de ces ions. Ces résultats, rapprochés des constatations précédentes sur le trypsinogène de structure secondaire et tertiaire intacte, permettent de préciser que l'action des ions calcium sur l'hydrolyse de la liaison Lys-Ileu se rapporte très probablement à la structure locale de la molécule modifiée ou intacte.

A ces données, il faut encore ajouter les constatations analogues sur la transformation du chymotrypsinogène en chymotrypsine : en effet, pendant l'activation rapide du zymogène par l'action de la trypsine, parmi les 17 liaisons peptidiques (4 liaisons arginyl et 13 liaisons lysyl) en principe susceptibles d'être hydrolysées par la trypsine, une seule est effectivement hydrolysée ; celle de l'arginyl-isoleucyl, et dans ce cas, comme dans celui du trypsinogène, le résidu isoleucyl de cette séquence se trouve lié par son carboxyle à un résidu valine (214, 215).

L'hypothèse de l'intervention d'une structure particulière, localisée autour de la liaison Lys-Ileu dans le cas du trypsinogène, présente l'attrait de pouvoir se soumettre à une vérification expérimentale au moyen des modèles peptidiques obtenus par synthèse.

C'est pour répondre à un tel programme que nous avons proposé à Monsieur le Professeur P. DESNUELLE d'entreprendre la synthèse des substrats de la trypsine comportant des éléments de structure de la séquence N-terminale du trypsinogène.

Les éléments de structure qui ressortent des constatations précédentes et que l'on doit retenir pour la synthèse des substrats-modèles de la trypsine, sont les suivants (énumérés dans l'ordre de leur position dans la chaine, en commençant par le bout C-terminal) :

1) la séquence Ileu-Val du côté C-terminal par rapport à la liaison hydrolysable

2) la présence des 4 résidus aspartiques ayant leur deuxième carboxyle libre et situés du côté N-terminal par rapport à cette liaison

3) la présence d'un groupement amine libre, appartenant à la valine N-terminale à une distance de 5 liaisons peptidiques à partir de la liaison Lys-Ileu.

Il est évident qu'en variant ces éléments on peut envisager la préparation d'un grand nombre de substrats de la trypsine concernant cette étude.

Dans le présent travail, nous rapportons uniquement la synthèse d'un tétrapeptide, d'un tripeptide, de deux dipeptides et de quelques dérivés simples de la lysine qui représentent les premiers exemples de ces substrats destinés à une étude enzymatique ultérieure.

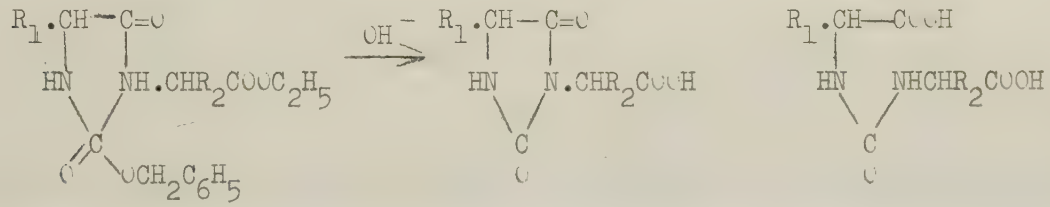
Problèmes envisagés, méthodes utilisées, résultats obtenus.

Pour choisir les groupements protecteurs et les méthodes de couplage adéquats dans la synthèse de ces peptides, il faut prendre en considération les difficultés particulières qui résultent de la présence d'un résidu valine en position C-terminale et de la présence de résidus lysine et acide aspartique dans la chaine peptidique.

La première de ces difficultés est la conséquence de l'effet stérique dû à la présence, dans la chaine latérale de la valine et de l'isoleucine, d'une ramification en β (isopropyle et butyle secondaire). En effet, ROBERTS (92) a constaté que l'ester éthylique de l'isoleucine appartenant à un tripeptide était très résistant à l'hydrolyse par les alcalis dans les conditions habituellement utilisées pour la saponification des esters de peptides. Plusieurs autres auteurs (219, 221) sont arrivés à saponifier avec moins de difficulté l'ester méthylique de peptides ayant cet acide aminé en position C-terminale. De même, pour saponifier les esters méthylique ou éthylique ou éthylique de la valine appartenant à des dipeptides N-acylés, HINMANN et et coll. (155) et VAUGHAN et EICHLER (145b) ont été obligés d'utiliser deux équivalents d'alcali. au lieu d'un,habituellement utilisé.

Dans une première synthèse du dipeptide protégé L-Ileu-L-Val, nous avons employé l'ester méthylique de la valine que nous avons couplé, par la méthode aux carbodiimides, avec la N-cbz-L-isoleucine. Après l'obtention de l'ester méthylique de la N-cbz-L-isoleucyl-L-valine, on envisageait de prolonger la chaine peptidique du côté N-terminal après avoir éliminé le groupement carbobenzoxy par hydrogénation catalytique. Cette voie, particulièrement avantageuse, a dû être abandonnée par la suite, en raison des réactions secondaires auxquelles peut conduire la saponification de cet ester relativement résistant : les essais préliminaires de saponification, réalisés avec l'ester méthylique de la N-cbz-L-isoleucyl-L-valine, ont montré que pour obtenir l'hydrolyse de cet ester il fallait employer plus d'un équivalent d'alcali, prolonger

son action ou élever la température. Or, dans ces conditions (surtout en présence de deux équivalents d'alcali), la saponification des esters carbobenzoxy peptides (I) conduit à la formation - à côté du produit de l'hydrolyse - des hydantoïnes substituées (II) ou des urées substituées (III)



I II III

suivant les réactions secondaires constatées à plusieurs reprises dans différents cas (voir McLAREN (91) qui cite les constatations antérieures) et plus particulièrement dans le cas des lysyl-peptides (90, 222).

D'autre part, l'hydrolyse alcaline, dans le cas où des résidus aspartyle se trouvent dans la chaine peptidique, peut provoquer la transposition de la liaison α-aspartyl- en liaison β-aspartyl- (voir ci-après).

Pour toutes ces raisons, nous avons finalement décidé d'éviter une saponification d'ester à la fin de la synthèse. Pour pouvoir appliquer l'hydrogénation catalytique comme moyen d'élimination du groupement carbobenzoxy et pour utiliser l'ester méthylique de la N-cbz-isoleucyl-valine déjà préparée, nous avons essayé de transformer ce dérivé en amide correspondante (par l'action de NH_3/CH_3OH à température ordinaire), afin d'employer l'amide à la place de l'ester pour masquer le carboxyle C-terminal. Mais, cette tentative n'a pas donné de résultats satisfaisants : l'ammoniolyse de cet ester, très lente et incomplète à la température ordinaire [+], conduisait à des

---

[+] Des constatations analogues ont été faites par SMITH et coll. (223), lors de l'amidation des esters de la valine et de l'isoleucine.

réactions secondaires mises en évidence par chromatographie sur papier des produits de l'amidation, après hydrogénation catalytique.

Ainsi, nous avons été amené à utiliser pour la protection du carboxyle du résidu valine, l'ester benzylique qui peut s'éliminer facilement à la fin de la synthèse, par hydrogénation catalytique.

Les essais de préparation de cet ester - qui n'était pas encore décrit dans la littérature - selon la méthode de MILLER et WAELSCH (93) ainsi que par la méthode de ERLANGER et HALL (94) nous ont donné des résultats très médiocres en raison des réactions secondaires intervenant pendant le chauffage à 120º - 125º (polymérisation et formation de produits colorés fluorescents). Par contre, la méthode de CIPERA et NICHOLLS (95), par distillation azéotropique avec un dispositif de Stark et Dean (voir PARTIE EXPERIMENTALE), nous a permis d'obtenir cet ester avec un bon rendement et sans réactions secondaires.

La carbobenzoxy-L-isoleucine a été préparée, suivant la méthode générale de BERGMANN et ZERVAS (13), sous la forme d'une huile qui ne cristallise pas, même après un long séjour à la glacière, ceci étant confirmé par plusieurs auteurs (224-226). Par couplage de ces deux dérivés, selon la méthode des anhydrides mixtes au chlorocarbonate d'éthyle, nous avons obtenu, à l'état cristallisé et avec un bon rendement (74%), l'ester benzylique de la N-cbz-L-isoleucyl-L-valine [+].

Il est intéressant de noter que, dans ce couplage, on ne remarque pas d'influence importante de l'effet stérique de la chaine ramifiée en β. Il en est de même pour la scission du groupement carbobenzoxy par HBr/CH_3COOH qui s'effectue normalement : par acidolyse du dérivé précédent, dans des conditions habituellement utilisées, nous avons

---

[+] Dans la littérature, on trouve décrit l'ester méthylique de la N-cyclopentyloxycarbonyl-DL-isoleucyl-DL-valine (mélange de quatre diastéréoïsomères) (67).

obtenu le bromhydrate de l'ester benzylique de la L-isoleucyl-L-valine à l'état cristallisé et pratiquement sans scission de l'ester benzylique.

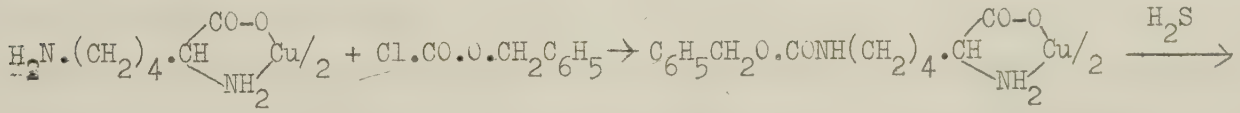
C'est ce dérivé que nous avons utilisé, par la suite, dans les couplages avec les dérivés de la lysine (voir ci-après).

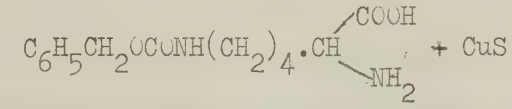
Le deuxième problème qu'on doit envisager concerne la lysine liée par ses fonctions α-amine et carboxyle et ayant sa fonction ε-amine libre.

L'introduction de la lysine dans la chaine peptidique nécessite la protection des fonctions α- et ε-amine dans le cas des lysyl-peptides (lysine en position N-terminale), et des fonctions ε-amine et α-carboxyle dans le cas où la lysine est en position C-terminale. Dans la synthèse des lysyl-peptides, si l'on envisage une prolongation ultérieure de la chaine, du côté N-terminal (synthèse par voie récurrente), on doit protéger les deux fonctions amine par des groupements différents, de sorte qu'il soit possible d'éliminer le groupement qui protège la fonction α-amine sans toucher à celui qui masque la fonction ε-amine.

Parmi les synthèses que nous avons eu à envisager pour la préparation des substrats de la trypsine, l'une des premières était celle du tripeptide L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine. Pour cela il fallait effectuer le couplage de la lysine, protégée par des groupements adéquats, avec l'ester benzylique de la L-isoleucyl-L-valine préparé précédemment. Pour choisir ces groupements de protection temporaire, il fallait prendre en considération 1) la présence d'un groupement O-benzyle qui ne doit s'éliminer qu'à la fin de la synthèse et 2) l'incorporation ultérieure, dans la même chaine, de résidus aspartyle protégés sur leur β-carboxyle par un groupement benzyle. Parmi les différentes possibilités que l'on pourrait envisager dans ce cas, nous avons chosi la protection de la fonction ε-amine par le groupement tosyle et celle de la fonction α-amine par le groupement carbobenzoxy. Ainsi, il est possible d'obtenir la scission du groupement N^{α}-carbobenzoxy par acidolyse (HBr/CH_3COOH), sans éliminer en même temps les groupements N^{ε}-tosyle et O-benzyle.

D'autre part, pour effectuer la synthèse des substrats de la trypsine sous forme des dérivés N^{α}-acyl-lysine ester ou amide, nous avions précédemment préparé par la méthode du complexe de la lysine avec Cu^{++}, selon KURTZ (227), la N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysine (228)





A partir de ce dérivé, nous avons préparé par une réaction de Schotten-Baumann, la N^{α}-tosyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysine à l'état cristallisé, utilisée par la suite pour obtenir les dérivés N^{α}-tosyl-L-lysine methyl ester et N^{α}-tosyl-L-lysine amide (substrats de la trypsine).

Par analogie avec le dérivé N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysine, nous avons préparé la N^{ε}-tosyl-L-lysine (suivant la technique utilisée par ERLANGER, SACHS et BRAND (146) pour la préparation du dérivé correspondant de la L-ornithine). A partir de ce dérivé, nous avons préparé la N^{α}-carbobenzoxy-N^{ε}-tosyl-L-lysine ainsi que l'ester méthylique de la N^{ε}-tosyl-L-lysine (chlorhydrate).

Le dérivé N^{α}-cbz-N^{ε}-tos-L-lysine a été couplé avec l'isoleucyl-valine benzyl ester par "activation" de la fonction amine du dipeptide ester avec l'o-phénylène-chlorophosphite, selon ANDERSON (140), comme dans le cas de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine (voir 2ème PARTIE de cet exposé). Ainsi nous avons obtenu l'ester benzylique de la N^{α}-carbobenzoxy-N^{ε}-tosyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine à l'état cristallisé. Des essais préliminaires pour utiliser le couplage par les anhydrides mixtes aux alcoyl-carbonates nous ont donné de très mauvais résultats (rendement très faible, produit difficile à purifier). D'autre part, les essais que nous avons effectués pour préparer l'azide du dérivé N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine à partir de l'hydrazide correspondant nous ont montré l'intervention d'une réaction secondaire assez importante du point de vue rendement (voir ci-après), de sorte que l'emploi de la méthode des

azides pour le couplage de ces dérivés de la lysine devenait peu rentable. Par contre, la méthode aux carbodiimides nous a donné de meilleurs résultats, mais le couplage par le phosphite amide dans le diethylphosphite à chaud nous a paru plus avantageux, tant du point de vue solubilité des deux partenaires du couplage dans un petit volume de solvant, que du point de vue pureté du produit final. Nos résultats étaient confirmés par du VIGNEAUD et coll. (197) qui ont décrit à cette période la synthèse d'un tétrapeptide amide de la séquence C-terminale de la lysine-vasopressine par l'emploi du même dérivé de la lysine et des couplages par des phosphite-amides. Depuis, plusieurs autres auteurs ont utilisé ce dérivé de la lysine dans différentes synthèses (35c, 36, 131c, 136, 231, 232).

L'introduction, dans la synthèse peptidique, de nouveaux réactifs pour la protection temporaire de la fonction amine (voir TABLEAU II, page 6 bis) permet aujourd'hui d'envisager d'autres solutions pour la double protection de la lysine, dont certaines présentent des avantages notables dans des cas particuliers. Ainsi, par exemple, SCHWYZER et coll. (54, 229), dans la récente synthèse d'un fragment de l'ACTH, ont utilisé les dérivés N^{α}-p-phenylazobenzyloxycarbonyl,N^{ε}-t-butyloxycarbonyl-L-lysine et N^{α}-carbobenzoxy,N^{ε}-t-butyloxycarbonyl-L-lysine, et HOFMANN et coll. (50, 230), dans les synthèses des hormones α-mélanostimuline (α-MSH) et corticotropine (ACTH) ont employé le dérivé N^{α}-carbobenzoxy-N^{ε}-formyl-L-lysine. Il faut noter cependant que dans ces deux cas on est obligé d'effectuer l'élimination du groupement N^{α}-carbobenzoxy par hydrogénation ctatlytique (les groupements N^{ε}-t-butyloxycarbonyl- et N^{ε}-formyl- ne résistant pas à l'acidolyse par HBr/CH_3COOH). Pour cette raison, ces deux solutions ne peuvent s'appliquer dans le cas de notre synthèse, à cause de la présence du groupement O-benzyle sur le carboxyl terminal, qui s'éliminerait dans ces conditions avant l'étape finale de la synthèse.

A partir de l'ester benzylique de la N^{α}-cbz-N^{ε}-tos-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine nous avons préparé le bromhydrate de l'ester benzylique de la N^{ε}-tos-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine après élimination du groupement N^{α}-carbobenzoxy par acidolyse (HBr/CH_3COOH).

Ce tripeptide ester, avec son groupement ε-amine protégé et son groupement α-amine libre, peut servir sous cette forme pour la prolongation ultérieure de la chaine, du côté N-terminal, par couplage avec un dérivé adéquat de l'acide aspartique. L'aboutissement projeté de cette synthèse par voie récurrente serait la reconstitution de la séquence complète du fragment de trypsinogène qui est impliqué dans le processus de la transformation de ce zymogène en trypsine, c'est-à-dire le peptide :

Val.Asp.Asp.Asp.Asp.Lys.Ileu.Val

A côté de cette synthèse par voie récurrente, nous avons effectué la préparation de quelques autres substrats de la trypsine. Ainsi, nous avons obtenu le tétrapeptide α(L-valyl)-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine, destiné à servir à l'étude comparative de la vitesse d'hydrolyse de la liaison L-lysyl-L-isoleucyl par la trypsine, en absence et en présence des résidus aspartyl situés entre le résidu valyl-(N-terminal) et L-lysyl-.

La synthèse de ce tétrapeptide a été effectuée selon les étapes suivantes : a) couplage de la N-cbz-L-valine avec l'ester méthylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine par les anhydrides mixtes aux alcoylcarbonates et obtention de l'ester méthylique de l'α(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine à l'état cristallisé b) saponification de cet ester dans les conditions habituelles et obtention de l'α(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine à l'état cristallisé c) le couplage de ce dérivé avec l'ester benzylique de la L-isoleucyl-L-valine par la méthode aux carbodiimides nous a donné l'ester benzylique de l'α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysyl-L-isoleucyl-L-valine obtenu à l'état cristallisé d) ce dernier, dissous dans l'acide acétique en présence d'un équivalent d'acide chlorhydrique, a été soumis à l'hydrogénation catalytique. Le tétrapeptide α(L-valyl)-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine (chlorhydrate), après recristallisation, donne une seule tache positive à la ninhydrine lors de la chromatographie sur papier, dans plusieurs mélanges de solvants.

La synthèse de ce tétrapeptide par jonction de deux dipeptides (α(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine et l-isoleucyl-L-valine benzyl ester) à l'aide de la dicyclohexyl-

carbodiimide est un procédé qui a été fréquemment utilisé dans la synthèse de divers peptides naturels, ces dernières années (voir TABLEAU I, p. 4 bis). Il faut noter que, d'après de récentes observations de divers auteurs (50b, 147, 148), pendant un tel couplage, une racémisation partielle de l'acide aminé dont le carboxyle est "activé" (la lysine dans le cas de notre synthèse) n'est pas exclue.

Pour déceler la présence éventuelle d'un diastéréoïsomère dans le produit obtenu après recristallisation, nous avons effectué l'hydrolyse d'une partie aliquote de ce tétrapeptide avec un excès de trypsine, dont la stéréospécifité est très stricte : l'examen, par chromatographie sur papier, des produits de l'hydrolyse enzymatique, nous a montré que la scission du tétrapeptide était totale et donnait deux fragments dont les taches correspondaient aux dipeptides témoins α-valyl-lysine et isoleucyl-valine. Ces résultats permettent de conclure que le tétrapeptide recristallisé était optiquement homogène.

Nous avons signalé précédemment l'essai que nous avons effectué pour appliquer la méthode des azides au couplage du dérivé N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine avec le peptide ester L-isoleucyl-L-valine benzyl ester, afin d'obtenir, après hydrogénation catalytique, le dérivé : N^{α}-tosyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine. La synthèse d'un tel substrat de la trypsine présentait l'intérêt de permettre l'élimination de l'effet inhibiteur sur l'hydrolyse par la trypsine, exercé par la fonction α-amine libre se trouvant au voisinage immédiat de la liaison hydrolysée dans le substrat lysyl-isoleucyl-valine. Le choix du groupement tosylé pour "masquer" la fonction α-amine de la lysine, était particulièrement indiqué. Il est connu en effet (212) que l'introduction du groupement tosyle, à la place du groupement benzoyle, sur la fonction α-amine d'un substrat de la trypsine rend plus facile l'hydrolyse de ce substrat. D'autre part, le couplage des acides aminés N^{α}-tosylés avec des esters d'acides aminés ou de peptides, par la méthode des anhydrides mixtes aux alcoyl-carbonates, conduit

à des réactions secondaires importantes et donne de très mauvais rendements.(233, 234)

Ainsi, nous avons préparé l'hydrazide de la N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine, et nous avons essayé d'effectuer le couplage en transformant ce dernier en l'azide correspondant. Cependant, dans plusieurs essais de préparation de ce dérivé, nous avons constaté la formation d'un produit secondaire qui s'éliminait en partie sous forme cristallisée. Nous avons identifié ce produit comme l'amide de la N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine : par hydrogénation catalytique nous avons obtenu le dérivé N^{α}-tosyl-N^{ε}-L-lysine amide. Ce dernier, soumis à l'action de la trypsine, était rapidement hydrolysé en donnant la N^{α}-tosyl-L-lysine (identifié par chromatographie sur papier, par comparaison avec un spécimen de ce dérivé, préparé précedemment par synthèse).

Cette réaction secondaire qui était assez importante dans le cas rapporté ici puisque cette amide a été isolée avec un rendement de 20 à 30 %, n'a attiré l'attention des chimistes que ces dernières années. Son mécanisme n'est pas encore élucidé. Elle a été précédemment signalée dans un cas analogue à celui que nous avons constaté : PRELOG et WIELAND (235) et, ensuite, BRENNER et BURCKHARDT (236) ont décrit l'obtention d'une amide pendant la préparation de l'azide de la dicarbobenzoxy-L-lysine à partir de son hydrazide, la formation d'un produit secondaire pendant cette réaction étant déjà signalée par BERGMANN, ZERVAS et GREENSTEIN (15a) sans que celui-ci soit identifié. Plus récemment ROBERTS (92) et HONZL et RUDINGER (160c), ainsi que ROESKE et coll. (197) et MacLAREN et coll. (237), ont décrit également cette transformation des azides en amides, dans le cas de la N-cbz- ou N-tos-S-benzyl-cysteinyl-tyrosine, de la N-cbz-S-benzyl-cysteinyl-alanine et de la N-cbz-S-benzyl-cystéine, utilisées dans la synthèse de l'ocytocine. Très récemment, RUDINGER et HONZL (238) ont préconisé un mode opératoire pour la préparation de ces azides qui, d'après ces auteurs, permet d'éliminer cette réaction.

Pour obtenir des substrats de la trypsine, plus sensibles que les peptides à

l'action hydrolytique de cet enzyme, nous avons essayé de préparer, d'après une suggestion du Professeur DESNUELLE, des substrats pour l'étude de l'activité estérasique de cette protéinase. Nous avons ainsi préparé les dichlorhydrates des esters méthyliques de la L-lysine et de la L-arginine à l'état cristallisé, en employant la méthode d'estérification de BRENNER et HUBER (202) au chlorure de thionyle. Nous avons également effectué l'estérification de la N^{ε}-cbz-L-lysine (et de la N^{ε}-tos-L-lysine) en utilisant la même méthode, avec des résultats très satisfaisants, c'est-à-dire sans scission appréciable du groupement N^{ε}-cbz et intervention d'autres réactions secondaires[+].

L'ester méthylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine (chlorhydrate) ainsi obtenu, a été utilisé, d'une part pour le couplage avec la N-cbz-L-valine dans la préparation du tétrapeptide α(L-valyl)-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine décrite précédemment et, d'autre part, pour la synthèse de substrats de l'activité estérasique de la trypsine : α-glycyl-L-lysine-methyl ester et α(α-L-aspartyl)-lysine methyl ester.

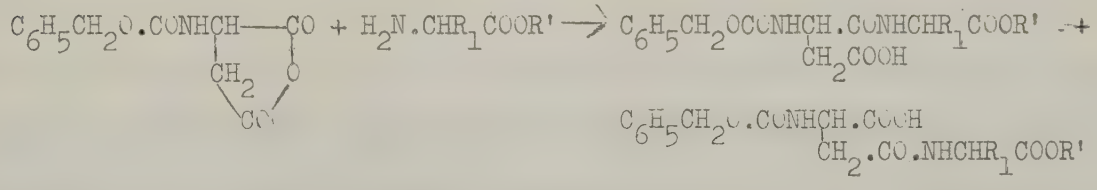
Pour obtenir le premier de ces deux peptides esters, nous avons effectué le couplage de la N-cbz-glycine avec l'ester méthylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine [+], par la méthode des anhydrides mixtes au chlorocarbonate d'éthyle : l'ester méthylique de l'α(N-cbz-glycyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine ainsi obtenu est un produit qui cristallise bien et présente des caractéristiques d'homogénéité satisfaisantes.

[+] L'ester méthylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine (chlorhydrate) est préparé habituellement, soit par méthanolyse du N^{α}-carboxy-anhydride de la N^{ε}-cbz-L-lysine, obtenu à son tour à partir de la N^{α}-N^{ε}-dicbz-L-lysine, selon BERGMANN, ZERVAS et ROSS (15b), soit par estérification par HCl/CH_3OH de la N^{ε}-cbz-L-lysine obtenue par la méthode du complexe de la lysine avec Cu^{++} (228). Dans ce dernier cas, on obtient un pourcentage de 5 à 10 % de l'ester méthylique de la lysine et des traces de l'amino-3-homopipéridone qui se forme par cyclisation intramoléculaire.

Ce dérivé par hydrogénation catalytique au noir de palladium, en présence d'un équivalent d'acide chlorhydrique, a donné un produit très hygroscopique, difficile à manipuler, présentant lors de la chromatographie sur papier une seule tache révélée par la ninhydrine. Cette tache se situe entre celles des témoins glycine et ester méthylique de la lysine.

Pour la synthèse du second substrat (α-(α-L-aspartyl)-L-lysine methyl ester) ainsi que pour l'incorporation d'un résidu aspartyl dans la chaine peptidique du dérivé N^{ε}-tos-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valyl benzyl ester, nous avons envisagé le problème de la synthèse des α-aspartyl-peptides.

La méthode classique pour la synthèse de ces peptides, proposée par BERGMANN et ZERVAS (13) consiste à effectuer l'aminolyse de l'anhydride de l'acide N-carbobenzoxy-L-aspartique par l'ester de l'acide aminé choisi. YOUNG et coll. (239, 240) ont montré que cette méthode, dans la plupart des cas, conduit à un mélange de dérivés α- et β-aspartyle dont la séparation n'est pas toujours facile

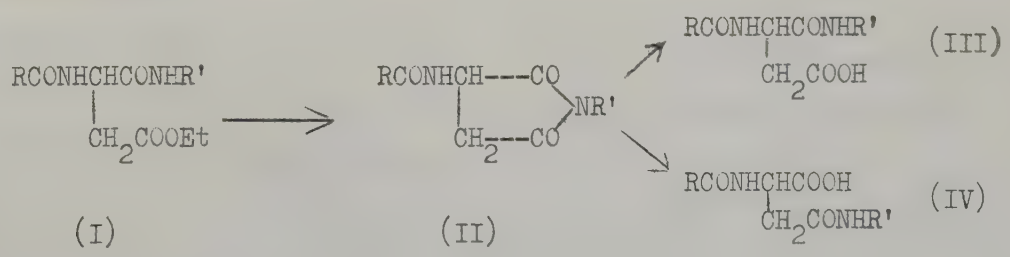


Ainsi, nous avons préféré utiliser pour ces synthèses une voie sans équivoque. Pour la synthèse de l'α-(α-L-aspartyl)-L-lysine methyl ester, il fallait utiliser un dérivé de l'acide aspartique, protégé à la fois sur les fonctions α-amine et β-carboxyle, de telle sorte que l'élimination de ces deux groupements de protection temporaire, à la fin de la synthèse,n'entraine pas l'élimination du groupement O-methyle (fixé sur le carboxyle de la lysine) qui doit rester en place à la fin de la synthèse.

Le dérivé qui répond à ces exigences est l'ester β-benzylique de l'acide N-cbz-L-aspartique. En effet, après le couplage de ce dérivé avec l'ester méthylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine et l'obtention du dérivé α(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl ester, on peut envisager d'éliminer les deux groupements de protection temporaire du résidu α-aspartyle en même temps que le groupement qui protège la fonction ε-amine du résidu lysine. Cette élimination s'effectue en une seule opération, par hydrogénolyse (H_2/Pd) sans que le groupement méthyle du carboxyle terminal soit touché.

En ce qui concerne l'incorporation des résidus α-aspartyle dans la chaine peptidique lysyl-isoleucyl-valine, au début de notre travail, nous avons envisagé l'utilisation de l'ester β-méthylique de l'acide N-cbz-L-aspartique que nous avons préparé dans ce but. Ce dérivé présentait, à nos yeux, l'avantage - très appréciable pour la construction d'une chaine peptidique par voie récurrente - de permettre l'élimination sélective du groupement N^{α}-carbobenzoxy par hydrogénolyse (H_2/Pd), sans toucher à la protection du β-carboxyle. Mais cet avantage se trouvait contre-balancé par le danger de réactions secondaires qui peuvent intervenir pendant l'hydrolyse alcaline que l'on est obligé d'employer à la fin de la synthèse pour éliminer le groupement méthyle.

En effet, BATTERSBY et ROBINSON (241) ont montré, en 1955, que les esters d'α- aussi bien que de β-aspartyl-peptides protégés donnent, lors de l'hydrolyse alcaline ménagée, un mélange des isomères α et β du peptide-acide. Cette transposition s'effectue par l'intermédiaire d'une cyclisation en imide (II) et l'hydrolyse de cette dernière conduit au mélange des deux isomères α et β (III et IV)



Ainsi, on se trouvait de nouveau devant le même résultat qu'avec la méthode de BERGMANN et ZERVAS, c'est-à-dire un mélange des isomères α et b.

Pour cette raison, nous avons abandonné l'utilisation de l'ester β-méthylique de l'acide N-cbz-L-aspartique dans la synthèse par voie récurrente, d'autant plus que la présence d'un groupement méthyle sur le carboxyle de la valine terminale exigeait des conditions d'hydrolyse alcaline plus favorables pour cette transposition.

Donc, pour la synthèse de ces deux catégories d'aspartyl-peptides, et pour des raisons différentes dans chaque cas, il était préférable d'employer l'ester β-benzylique de l'acide N-cbz-L-aspartique.

Ce dérivé était utilisé par BERGER et KATCHALSKI (242) pour la synthèse de l'acide α-poly-aspartique. Il est obtenu par hydrolyse partielle du diester benzylique de l'acide N-cbz-L-aspartique. Ce dernier est préparé par estérification de l'acide N-cbz-L-aspartique par l'alcool benzylique en présence d'acide p-toluène-sulfonique.

Nous avons préparé ce dérivé, d'une part à partir du diester benzylique de l'acide N-cbz-L-aspartique, et d'autre part par carbobenzoxylation de l'ester β-benzylique de l'acide-L-aspartique, préparé selon la méthode qui nous a été aimablement communiquée par le Professeur E. KATCHALSKI (243). Ce deuxième procédé présente l'avantage de permettre un contrôle plus facile de l'homogénéité du monoester obtenu[+] et l'élimination par recristallisation, des traces d'isomère α et d'acide aspartique présents.

Nous avons couplé l'ester β-bentylique de l'acide N-cbz-L-aspartique avec la N^{ε}-cbz-L-lysine methyl ester par la méthode des anhydrides mixtes au chlorocarbonate

---

[+] En effet, en comparant, par chromatographie sur papier, les α- et β-benzyl-esters de l'acide aspartique, nous avons constaté que les taches du dérivé α donnent, avec la ninhydrine, une coloration violette tandis que les taches correspondant à un dérivé β- se colorent en jaune-abricot.

d'éthyle, sans rencontrer de difficultés particulières. Le dérivé α(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl ester[+] a été obtenu à l'état cristallisé et avec des caractéristiques d'homogénéité satisfaisantes (p.f. constant après deux recristallisations, analyse élémentaire satisfaisante et examen par chromatographie sur papier montrant une seule tache révélée au chlore (206)).

Récemment, YOUNG et coll. (244) ont décrit également l'emploi de ce dérivé de l'acide aspartique pour la synthèse de divers α-aspartyl-peptides avec, comme deuxième partenaire, parmi divers autres esters d'acides aminés, l'ester benzylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine. Pour effectuer ce dernier couplage, ces auteurs ont essayé plusieurs méthodes : l'activation de la fonction amine du deuxième partenaire par l'éthylène chlorophosphite ou l'activation de la fonction carboxyle par divers esters activés, avec des résultats très peu satisfaisants ; la méthode des anhydrides mixtes au chlorocarbonate d'isobutyle a donné ici aussi les meilleurs résultats.

L'hydrogénation catalytique du α(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-L-lysine methyl ester (dissous dans l'acide acétique), en présence d'un équivalent d'acide chlorhydrique, nous a donné un produit présentant, après chromatographie sur papier, une seule tache révélée par la ninhydrine (R_F 0,17), située entre la tache de l'acide aspartique (R_F 0,11) et celle de l'ester méthylique de la lysine (R_F 0,23) dans un mélange de n-butanol-pyridine, d'acide acétique, eau (30:20:6:24).

Le produit, obtenu sous forme de chlorhydrate, se présente comme un solide déliquescent, difficile à manipuler.

Nous avons essayé d'effectuer l'hydrogénation catalytique dans l'acide acétique, en absence d'acide chlorhydrique, mais dans ce cas, au lieu d'un produit donnant une seule tache (R_F 0,17), nous avons obtenu un mélange, présentant, à côté de la première,

---

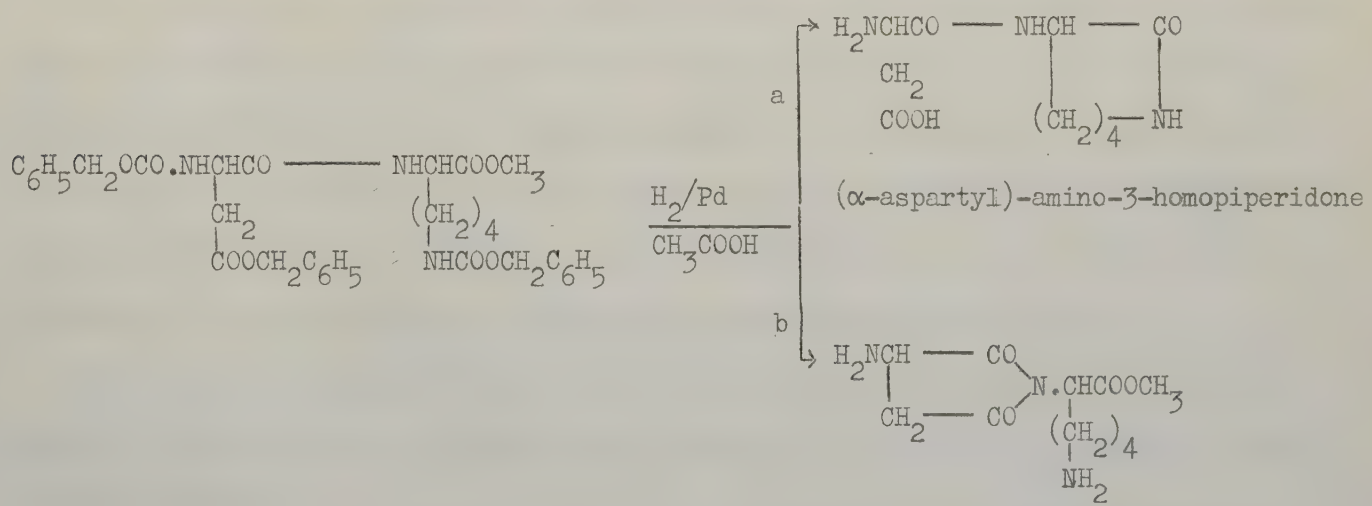
[+] Le dérivé α(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine-amide a été obtenu de la même manière par couplage avec l'amide de la N^{ε}-cbz-lysine.

une seconde tache de R_F 0,42. L'intensité de cette dernière augmentait au dépens de la première si l'on prolongeait l'hydrogénation ou si l'on conservait en solution le produit obtenu après hydrogénation.

Par chromatographie préparative sur papier et élution séparée des taches, nous avons obtenu de petites quantités de chacune de ces substances : le produit correspondant à la tache parasite (R_F 0,42), soumis à l'électrophorèse sur papier, à différents pH, se comportait comme une substance amphotère.

D'autre part, nous avons préparé les dérivés N-2,4 dinitrophényle (DNP) de chacune de ces deux substances et, après hydrolyse de ces dérivés, nous avons caractérisé, par chromatographie sur papier, les N-DNP-aminoacides isolés, par comparaison avec des DNP-aminoacides témoins : le dérivé de la substance principale (α-(α-L-aspartyl)-L-lysine methyl ester) a donné deux taches, l'une correspondant à l'acide N^{α}-DNP-aspartique et l'autre à la N^{ε}-DNP-lysine ; le dérivé de la substance parasite a donné, par contre, une seule tache correspondant à la N^{ε}-DNP-lysine.

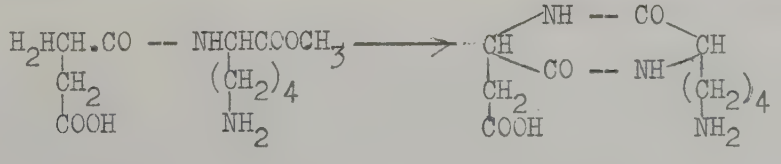
Pour expliquer la formation du produit secondaire, on peut envisager l'intervention des réactions suivantes :



Effectivement, BARRASS et ELMORE (245) ont constaté la formation d'une lactame cyclique pendant l'hydrogénolyse des esters ou des amides de la N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-lysine et des dérivés correspondants de l'ornithine et de l'acide α,γ-diaminobutyrique. Mais la formation de ce dérivé (réaction a), dans notre cas, ne se confirme pas par les résultats donnés par le DNP-dérivé (absence d'acide N^{α}-DNP-aspartique et présence de N^{ε}-DNP-lysine). La formation d'un dérivé de l'aminosuccinimide (réaction b), d'après SWALLOW et ABRAHAM (246), intervient pendant le traitement du peptide naturel de la bacitracine (qui comporte une liaison aspartyl-lysine) par l'acide chlorhydrique, à 80º. Les peptides synthétiques ε(aspartyl)-lysine et α(aspartyl)-lysine, soumis à l'action de l'acide chlorhydrique, dans les mêmes conditions, se cyclisent en donnant le dérivé correspondant de l'aminosuccinimide (246). L'intervention de cette réaction dans notre cas était encore moins probable que la précédente : les conditions d'hydrogénolyse du dipeptide ester, dans l'acide acétique et à température ordinaire, étaient assez éloignées des conditions d'hydrolyse utilisées par SWALLOW et ABRAHAM. Les résultats de l'électrophorèse sur papier ont montré d'ailleurs que le produit secondaire, dans notre cas, ne se comportait pas comme un cation mais comme un ions amphotère.

Les observations de SWALLOW et ABRAHAM indiquent que l'intervention de cette réaction de cyclisation doit très probablement être plus importante pendant l'acidolyse du groupement N^{α}-carbobenzoxy des aspartyl-peptides, par HBr/CH_3COOH ; des essais préliminaires de scission des groupements carbobenzoxy du dérivé α(α-N^{α}-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl ester, par cette méthode, nous ont montré, en effet, la présence de taches parasites, révélées par chromatographie sur papier.

Une troisième éventualité à envisager, pour expliquer la présence du produit secondaire, était la formation d'une dicétopiperazine par cyclisation du dipeptide ester suivant le schéma :



Cette dernière hypothèse est en accord avec les résultats de l'électrophorèse et de l'examen des DNP-aminoacides. Elle permet, en outre, d'expliquer l'absence de formation du produit secondaire pendant l'hydrogénolyse en présence d'un équivalent d'acide chlorhydrique : la salification de la fonction α-amine stabilise, dans ce cas, le peptide ester, et empêche sa cyclisation en dicétopiperazine.

Ces résultats montrent que : 1) l'obtention, sous forme de chlorhydrates, de l'α(glycyl)-L-lysine methyl ester et de l'α(α-l-aspartyl)-L-lysine methyl ester (ainsique de leurs amides correspondantes) conduit à des produits très hydroscopiques ou déliquescents qui ne sont pas facilement utilisables comme substrats de la trypsine, 2) la tendance de ces peptides esters de se transformer rapidement en dicétopiperazines lorsqu'ils ne sont pas à l'état de sels, rend difficile l'étude cinétique de leur hydrolyse enzymatique. Pour ces raisons, nous n'avons pas poursuivi la préparation de ces dipeptides-esters-substrats de la trypsine.

Les nombreuses réactions secondaires qui peuvent intervenir pendant la préparation des peptides comportant la liaison -aspartyl-lysyl-, rendent particulièrement difficile le choix des divers groupements de protection que l'on doit utiliser pendant la synthèse de ces peptides, et surtout l'emploi des divers moyens d'éliminer ces groupements protecteurs à la fin de la synthèse. D'après les observations récentes que nous avons citées précédemment, ainsi que d'après nos propres résultats d'essais préliminaires, dans ces synthèses, il faut éviter d'employer non seulement l'hydrolyse alcaline pour éliminer ces groupements protecteurs (esters méthyliques) mais aussi, dans la mesure du possible, une acidolyse par des acides forts.

La suite de la synthèse par voie récurrente du peptide de la séquence N-terminale du trypsinogène, c'est-à-dire l'incorporation des résidus α-aspartyl- dans la chaine peptidique du dérivé N^{ε}-tos-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine benzyl ester, s'avère particulièrement délicate. L'introduction de nouveaux groupements de protection pour les fonctions amine et carboxyle, donne l'espoir que l'on parviendra à résoudre d'un manière satisfaisante ce problème particulier.

Résumé de la Troisième Partie

I. Les travaux de DESNUELLE, de NEURATH et de leurs collaborateurs ont montré que la transformation du trypsinogène en enzyme actif, en présence de trypsine et d'ions calcium, est déclenchée par la rupture d'une seule liaison peptidique, située à proximité du bout N-terminal de la chaine peptidique de cette protéine. Cette protéolyse, par l'action de la trypsine, malgré la présence, dans la molécule du trypsinogène, de plusieurs résidus lysine et arginine, est limitée si elle s'effectue en présence d'ions calcium, à l'hydrolyse de la liaison -Lysyl-isoleucyl- qui occupe la sixième place dans la séquence N-terminale de cette chaine.

Nous avons entrepris la synthèse de substrats peptidiques de la trypsine reproduisant certains éléments de structure de cette partie de la chaine peptidique du trypsinogène, dans le but d'aborder ultérieurement l'étude de cette hydrolyse préférentielle au moyen des modèles peptidiques synthétiques.

II. Les dérivés dont nous avons effectué la synthèse sont les suivants :

1. N^{α}-cbz-N^{ε}-tos-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine benzyl-ester (cristallisé)
2. N^{ε}-tos-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine benzyl-ester, HBr (crist.)
3. α(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysyl-L-isoleucyl-L-valine benzyl-ester (crist.)
4. α(L-valyl)-lysyl-L-isoleucyl-L-valine, HCl (crist.)
5. α(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl ester (crist.)
6. α(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine (crist.)
7. α(N-cbz-glycyl)-L-(N^{ε}-cbz)-L-lysine methyl-ester (crist.)
8. α-glycyl-L-lysine methyl-ester, HCl (et HBr) (solides deliquescents)
9. α(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester (crist.)
10. α(α-L-aspartyl)-L-lysine methyl-ester (solide très hygroscopique)
11. Dibenzyl-ester de l'acide N-cbz-L-valyl—aspartique (crist.)
12. Acide-L-valyl—aspartique (crist.)
13. N-cbz-L-isoleucyl-L-valine methyl-ester (crist.)

14. N-cbz-L-isoleucyl-L-valine (crist.)

15. N-cbz-L-isoleucyl-L-valine benzyl-ester (crist.)

16. L-isoleucyl-L-valine benzyl-ester, HBr (crist.)

17. N^{ε}-cbz-L-lysine methyl-ester HCl (crist.)

18. N^{ε}-tos-L-lysine (crist.)

19. N^{ε}-tos-L-lysine methyl-ester, HCl (crist.)

20. N^{α}-cbz-N^{ε}-L-lysine (crist.)

21. N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine (crist.)

22. N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine hydrazide (crist.)

23. N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine amide (crist.)

24. N^{α}-tos-L-lysine-amide, HCl (crist.)

25. N^{α}-tos-L-lysine (crist.)

26. β-Methyl-ester de l'acide N-cbz-L-aspartique (crist.)

27. β-Benzyl-ester de l'acide N-cbz-L-aspartique (crist.)

28. β-Benzyl-ester de l'acide L-aspartique (crist.)

29. α-Benzyl-ester de l'acide L-aspartique (crist.)

30. L-valine benzyl-ester chlorhydrate (et p-toluenesulfonate) (crist.)

III. Les groupements de protection temporaire employés pendant la synthèse de ces dérivés étaient choisis suivant le cas envisagé : la protection de la fonction carboxyle de la lysine a été effectuée par le groupement méthyle tandis que les fonctions carboxyle de la valine C-terminale et β-carboxyle de l'acide aspartique N-terminal ou α- et β-carboxyles de l'acide aspartique C-terminal ont été protégées par des groupements benzyle pouvant s'éliminer par hydrogénolyse. On écarte ainsi les réactions secondaires qui peuvent intervenir dans ces cas particuliers pendant l'hydrolyse alcaline utilisée pour l'élimination des esters aliphatiques.

La protection des fonctions α-amine a été réalisée, dans tous les cas, par le groupement carbobenzoxy, tandis que la fonction ε-amine était masquée par le groupe-

ment tosyle dans la synthèse par voie récurrente (dérivés 1 et 2), et par le groupement carbobenzoxy dans les autres cas (dérivés 3 à 10).

IV. La synthèse des dérivés tripeptidiques (1 et 2) a été réalisée par voie récurrente et la synthèse des dérivés tétrapeptidiques (3 et 4) par jonction des dérivés dipeptidiques 6 et 16. Les dérivés dipeptidiques ont été obtenus par la méthode des anhydrides mixtes aux alcoylcarbonates, à l'exception du dérivé 13, obtenu par la méthode aux carbodiimides. Le couplage de la N^{α}-cbz-N^{ε}-tos-lysine avec l'ester benzylique de l'isoleucyl-valine a été effectué par la méthode à l'o-phénylène chlorophosphite (procédé à l'amide). Le couplage entre les dérivés dipeptidiques 6 et 16 a été réalisé par la dicyclohexylcarbodiimide.

V. L'élimination du groupement carbobenzoxy a été faite par acidolyse (HBr/CH_3COOH) dans le cas des dérivés 2, 16 et 29, et par hydrogénolyse (H_2/Pd) dans tous les autres cas (dérivés 3, 6, 10, 12, et 24). L'élimination du groupement ester méthylique a été réalisé par hydrolyse alcaline dans le cas des dérivés 6 et 14, et celle des groupements benzyl-ester par hydrogénolyse, simultanément avec les groupements N^{α} et N^{ε}-carbobenzoxy (dérivés 4, 8, 10, 12).

VI. Pendant ces synthèses, nous avons constaté l'intervention de deux réactions secondaires : la première est la formation d'une amide pendant la transformation de l'hydrazide de la N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine en azide correspondant, la seconde est observée pendant l'hydrogénation catalytique des dérivés α(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester et α(N-cbz-glycyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester, en absence d'acide fort : elle consiste, très probablement, en la formation de dicétopipérazines par cyclisation de ces dipeptides esters.

TABLEAU VIII: Valeurs R_F des dérivés et des peptides de l'histidine.
(Chromatographie descendante sur papier Whatman 1 et Whatman 4).

Dérivés des acides aminés et des peptides	Solvents de développement * I	II	III	IV	Réactifs de révélation Ninhydrine	Pauly	Iode**	β-méthyl-ombelliférone ***
1. N^{im}-bzy-His	0,36	0,54	0,59	0,42	+	-	+	-
2. N^{im}-bzy-His-me	0,55	0,84	0,80	0,81	+	-	+	-
3. N-bzy-N^{im}-bzy-His	0,69	0,78	-	0,77	-	-	+	-
4. N-cbz-N^{im}-bzy-His	0,81	0,76	-	0,81	-	-	+	-
5. N-Tri-N^{im}-bzy-His-me	0,90	0,92	0,95	-	≠	-	+	-
6. N-Tri-N^{im}-bzy-His	0,88	0,83	0,94	-	≠	-	+	-
7. N-cbz-N^{im}-bzy-His-Gly-me	0,84	0,91	-	-	-	-	+	-
8. N-cbz-N^{im}-bzy-His-Gly-et.,	0,87	0,93	-	-	-	-	+	-
9. N-cbz-N^{im}-bzy-His-Gly	0,81	0,72	-	0,77	-	-	+	-
10. N^{im}-bzy-His-Gly-et., 2 HBr	0,61	-	0,86	0,83	+	-	+	-
11. N^{im}-bzy-His-Gly	0,31	0,47	0,55	0,29	+	-	+	-
12. His-Gly, HCl	0,09	0,22	0,23	0,09	+	+	+	-
13. N-cbz-N^{im}-bzy-His-Leu-me	0,89	0,92	-	-	-	-	+	-
14. N-cbz-N^{im}-bzy-His-Leu	0,89	0,82	-	0,91	-	-	+	-
15. N^{im}-bzy-His-Leu-me	-	-	0,91	0,90	+	-	+	-
16. N^{im}-bzy-His-Leu	-	0,72	0,83	0,60	+	-	+	-
17. N-cbz-His-Leu-me	0,84	0,90	0,94	-	-	+	+	-
18. N-cbz-His-Leu	0,83	0,78	0,90	0,80	-	+	+	-
19. His-Leu, HCl	0,33	0,53	0,56	0,28	+	+	+	-
20. N-cbz-Pro	-	0,68	-	-	-	-	-	+
21. N-cbz-Val	-	0,77	-	-	-	-	-	+
22. N-cbz-Pro-Phe-me	0,92	0,91	-	-	-	-	+	-
23. Pro-Phe-me, HBr	0,75	-	0,88	0,90	isatine +	-	+	-
24. Pro-Phe	-	-	0,65	0,38	isatine +	-	+	-
25. N-cbz-N^{im}-bzy-His-Pro-Phe-me	0,91	0,92	-	-	-	-	+	-

26. N-cbz-N^{im}-bzy-His-Pro-Phe	0,88	0,82	-	0,88	+	-	+	-
27. N^{im}-bzy-His-Pro-Phe-me, 2 HBr	-	0,83	0,90	0,86	+	-	+	-
28. N^{im}-bzy-His-Pro-Phe	-	0,67	0,81	-	+	-	+	-
29. N-cbz-Val-N^{im}-bzy-His-Pro-Phe-me	0,90	0,93	-	-	-	-	+	-
30. Val-N^{im}-bzy-His-Pro-Phe-me, 2 HBr	-	-	0,92	0,92	+	-	+	-
31. Anhydride de l'histidine	0,11	0,18	0,31	0,13	-	+	+	-

x : I = n-butanol/ac.acétique glac./eau (65:10:25), (207), papier Whatman 1
II= n-butanol/éthanol/ammoniaque conc./eau (40:40:10:10), (208), papier Whatman 1
III= n-butanol/pyridine/ac.acétique glac./eau (30:20:6:24), (90), papier Whatman 1
IV= méthyléthylcétone/pyridine/eau (60:15:20), (30),papier Whatman n°4

xx : d'après Cowgill (204a) et suivant la technique de Smith (204b)

xxx : d'après Schlögl et coll. (208)

≠ : la révélation à la ninhydrine est possible après chauffage des chromatogrammes pendant 15 minutes à 100°

PARTIE EXPERIMENTALE

Le point de fusion des dérivés décrits a été déterminé au capillaire (Fc) ou au bloc Maquenne (F instantané). Les valeurs indiquées ne sont pas corrigées. La mesure des constantes physiques et les analyses ont été effectuées sur des produits séchés au moins pendant 8 heures sous 10^{-2} mm de Hg et à des températures différentes, indiquées dans chaque cas. Les analyses élémentaires ont été effectuées par les Laboratoires de microanalyse de la Société CIBA à Bâle (Dr. Gysel), de la Faculté de Médecine de Paris (Mme Abramson), de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette (R. Lévy), et par le Service de Recherches analytiques de la Société des Usines chimiques Rhône Poulenc (F. Floret), qui a effectué aussi les dosages d'eau selon Fischer.

Les chromatographies sur papier ont été faites par la méthode descendante sur papier Whatman nº 1 dans des mélanges de solvants indiqués au TABLEAU VIII, dans lequel nous avons réuni les valeurs de R_F de plusieurs dérivés de l'histidine. Pour obtenir rapidement des renseignements sur la marche d'une réaction ou sur la pureté du produit obtenu, nous avons utilisé le papier Whatman nº 4 et le mélange méthyléthylcétone/pyridine/eau (60:15:20) ; dans ces conditions, 1 à 2 heures sont suffisantes pour le développement des chromatogrammes. Pour la révélation des chromatogrammes développés, nous avons employé la technique de l'immersion selon SMITH (204b). Les réactifs utilisés dans les différents cas étaient les suivants : la ninhydrine pour les dérivés des acides aminés et des peptides ayant une fonction amine libre ; l'isatine pour les dérivés de la proline ayant la fonction imine libre ; le réactif de Pauly (acide sulfanilique diazoté) pour les dérivés de l'histidine dont le noyau imidazolique n'est pas protégé ; le réactif à l'iode (204a) en solution dans CCl_4, selon SMITH (204b), pour les dérivés de l'histidine dont les fonctions α-amine et imine sont masquées ; la β-méthylombelliférone, indicateur fluorescent de pH (208)

pour les dérivés acides des aminoacides et des peptides N-acylés, et enfin, la méthode au chlore/KI/o-tolidine, selon REINDEL et HOPPE (206), pour le reste des dérivés qui ne se révèlent par aucun des réactifs enumérés précédemment.

A. L-HISTIDYL-PEPTIDES

1. Pouvoir rotatoire de la N^{im}-benzyl-L- et D-histidine et de la N^{α}-benzyl-N^{im}-benzyl-L-histidine.

La préparation des dérivés mono- et dibenzylés a été effectuée suivant la méthode de du VIGNEAUD et BEHRENS (180), exactement dans les conditions utilisées par ces auteurs : des monochlorhydrates monohydrates de la L-histidine et de son isomère optique, de provenance Hoffmann-LaRoche et C^{ie}, ont été dissous dans l'ammoniac liquide anhydre et benzylés après addition de 4 équivalents de sodium métallique par 1,1 équivalent de chlorure de benzyle fraichement distillé.

Les dérivés L- et D-N^{im}-benzyl-histidine ainsi préparés, après une première recristallisation dans l'alcool à 70% et une deuxième dans l'eau chaude, examinés par chromatographie sur papier, ont donné une seule tache, positive à la ninhydrine et négative au réactif de Pauly ; la révélation par l'iode n'a pas montré la présence du dérivé disubstitué (des traces étant signalées dans les eaux-mères de la 1ère recristallisation).

Fc = 248,5º déc. (corrigé) Litt. (180) : 248º-249º (corrigé)

Le pouvoir rotatoire(mesuré sur plusieurs préparations) du dérivé N^{im}-bzy-L-histidine était compris entre $[\alpha]_D^{30}$ + 11±1 et $[\alpha]_D^{20}$ + 10,1±1 (c=2, eau et 1 équiv. HCl) et (sur une préparation) de la N^{im}-bzy-D-histidine avait la valeur $[\alpha]_D^{20}$ - 10,9±1

Litt.* (180) : $[\alpha]_D^{34}$ + 20,5 et (247): $[\alpha]_D^{10}$ + 16,2º pour la forme L et (247): $[\alpha]_D^{10}$ - 16,3º

---

* voir p. 41-42 pour la valeur du pouvoir rotatoire de ce composé.

pour la forme D (c=2, eau et 1 équiv. HCl).

Analyse de la N^{im}-L-histidine (séchée à 100º)

$C_{13}H_{15}O_2N_2$ = 245,27 Calc. % : C 63,64 H 6,17 N 17,14

Tr. : 63,34 6,31 17,05

Le dérivé N^{α}-benzyl-N^{im}-benzyl-L-histidine obtenu des eaux-mères de cristallisation du dérivé monosubstitué d'une des préparations précédentes, après deux recristallisations, a donné, par chromatographie sur papier, une seule tache, révélée par l'iode, négative à la ninhydrine et au réactif de Pauly. Son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{20}$ + 17,5º±1 (c=2, eau et 1 équiv. HCl) Litt.* (180) $[\alpha]_D^{34}$ + 34,5º (c=2, eau et 1 équiv. HCl)

2. Hydrogénation catalytique de la N^{im}-bzy-L-histidine.

Des essais d'hydrogénolyse de la N^{im}-bzy-L-histidine ont été effectués à 20º, à 37º et à 50º, en présence de noir de palladium fraichement préparé. Après 7 heures d'hydrogénation à 20º, en solution méthanolique, de 0,2 mM en présence d'un équivalent d'HCl, la scission du N^{im}-benzyle est très faible : la tache d'histidine libérée, révélée par chromatographie sur papier, est environ dix fois plus petite que celle du produit non débenzylé. A 37º, 0,5 mM de N^{im}-bzy-L-histidine dissoute dans l'acide acétique à 80% (en présence d'un équivalent d'HCl) est complètement débenzylée après 10 heures. Par chromatographie sur papier, on révèle dans ce cas, à côté de la tache de l'histidine, deux autres taches d'une intensité beaucoup plus faible : la première, positive au réactif de Pauly et négative à la ninhydrine, a une valeur R_F dans le solvant II** de 0,29 (R_F de l'histidine = 0,21), et se distingue de la tache témoin de l'anhydride de l'histidine (R_FII = 0,18) . La deuxième est positive à la

---

* voir p. 41-42 pour la valeur du pouvoir rotatoire de ce composé.

** voir le TABLEAU VIII p. 79 bis

ninhydrine ($R_F I = 0,43$) et négative au réactif de Pauly.

En effectuant l'hydrogénation catalytique à 50º, nous avons obtenu la débenzylation complète après 4 heures, sans apparition, cette fois, de produit secondaire. Ainsi, 122 mg de N^{im}-bzy-L-histidine (0,5 mM) dissous dans 3 cc d'acide acétique à 80% et un équivalent de HCl, sont hydrogénés en présence de noir de Pd pendant 4 heures 1/2. Après filtration du catalyseur et élimination du solvant, le résidu est recristallisé dans l'eau/éthanol (2:3). On obtient 66 mg (63%) de chlorhydrate de L-histidine, chromatographiquement pur. Son pouvoir rotatoire, $[\alpha]_D^{20}$ + 13,7º±1 (c=1,49, HCl 6N, calculé sur la base libre) (Litt. (248) $[\alpha]_D^{19}$ + 13,55º (c=1,5, HCl 4,5N), montre qu'il n'y avait pas eu racémisation pendant la préparation de la N^{im}-bzy-L-histidine.

D'autre part, nous avons effectué l'hydrogénation à 23º, en utilisant comme catalyseur une préparation de Palladium sur charbon à 5%, de fabrication Baker et C^{ie} : après 12 heures, la scission était incomplète (environ 60% de scission), mais après 24 heures l'hydrogénolyse était totale, sans formation de produit secondaire.

3. N^{α}-carbobenzoxy,N^{im}-benzyl-L-histidine.

7,35 g (0,03M) de N^{im}-bzy-L-histidine ($[\alpha]_D$ + 11º) dissous dans 30 cc de soude N sont traités avec 5,1 cc de chlorure de carbobenzoxy* (20% d'excès) et 36cc de soude N ajoutés en 5 portions sous agitation vigoureuse et refroidissement pendant 1 heure. On continue l'agitation à la température du laboratoire pendant encore 2 heures. Le sel de sodium de la N-cbz-N-bzy-L-histidine est très peu soluble dans l'eau. Après addition d'eau et extraction à l'éther de l'excès de chlorure de carbobenzoxy, la solution claire est acidifiée attentivement avec HCl 6N jusqu'à pH 6,5 en raison du caractère amphotère de la N-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine : soluble en milieu fortement

---

* voir plus loin : Préparation des réactifs.

acide et alcalin, elle précipite entre pH 3 et 7. Le précipité essoré est lavé abondamment à l'eau froide et séché au dessicateur : on obtient 9,25 g (rend. 85%). Pour l'analyse, le produit est recristallisé dans l'alcool butylique normal en très fines aiguilles lancéolées, ou dans la pyridine Fc = 214º-215º (Litt. (41) : 216º) (195a) : 210º-213º et (191) : 212º-213º

$[\alpha]_D^{20}$ - 17,6º±1 (c=2, HCl N) (Litt. (191) : $[\alpha]_D^{28}$ - 16,3º (c=2, HCl N) et $[\alpha]_D^{21}$ + 8,1º±1 (c=5, acide acétique glacial) et $[\alpha]_D^{22}$ + 6,4º±1 (c=1, acide acétique glacial) (Litt. (195a)) : $[\alpha]_D^{21}$ + 5,2º (c=5, acide acétique glacial))

Analyse (produit séché à 100º)

$C_{21}H_{21}O_4N_3$ = 379,4 Calc. % : C 66,47 H 5,55 N 11,07

Tr. : 66,76 5,79 11,24

La N^{δ}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine, après chromatographie sur papier, ne réagit pas avec la β-méthylombelliférone qui est utilisée pour la révélation des autres acides aminés N-acylés, mais elle se colore en jaune-brun par l'iode.

Par électrophorèse sur papier Whatman nº 1 sous 500 volts et sous refroidissement, le dérivé N-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine migre vers la cathode à pH 2,3 (acide formique/acide acétique/eau 9:6:985 en volume), reste pratiquement immobile à pH 6,0 (acide acétique/pyridine/eau 3:27:970 en volume) et migre vers l'anode à pH 8,9 (solution de tris (hydroxyméthyl) aminométhane N/20 ajustée à pH 8,9 par HCl 2N). De même le dérivé N-cbz-N^{im}-bzy-histidine se déplace vers la cathode à pH 2,3 et 6,0 et commence à migrer vers l'anode à pH 8,9.

4. Ester éthylique de la N^{α}-cbz-N^{im}-L-histidyl-glycine.

A une solution de glycinate d'éthyle (obtenue à partir de 280 mg (2 mM) de son chlorhydrate, par neutralisation avec une solution chloroformique de NH_3, suivant la méthode de HILLMANN (249))dans 4 cc de diéthyphosphite* et de 0,28 cc (2 mM) de

* Provenance : Virginia-Carolina Chemical Corporation, Richmond, Virginia, U.S.A.

triéthylamine, on ajoute 0,25 cc d'o-phénylènechlorophosphite+. Au mélange chauffé 5 minutes au bain de vapeur, on ajoute 680 mg (1,8 mM) de N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine en plusieurs portions ; Après chauffage au bain de vapeur, sous agitation, pendant encore 30 minutes, la solution s'éclaircit. Le produit de la réaction, versé dans 100 cc d'eau glacée, précipite, et la précipitation est complétée par addition, sous refroidissement, de soude 2 N jusqu'à pH 7. Le précipité est extrait à l'acétate d'éthyle, la solution obtenue est lavée abondamment avec du Na_2CO_3 à 10 % à froid, et à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous vide. L'ester éthylique de la N-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-glycine cristallise pendant la distillation. On obtient 660 mg (rendement 79 %). On recristallise dans l'acétate d'éthyle.

Fc : 121º-122,5º (ramoll. à 119º)

Analyse : (produit séché à 78º)

$C_{25}H_{28}O_5N_4$ = 464,5 Calc. % : C 64,63 H 6,07 N 12,06

Tr. : 64,38 6,05 11,92

5. Ester méthylique de la N^{α}-cbz-N^{im}-L-histidyl-glycine.

On l'obtient selon la méthode operatoire indiquée précédemment, avec un rendement de 61 %. On recristallise pour l'analyse dans l'acétate d'éthyle.

Fc : 109º - 110º $[\alpha]_D^{20}$ -3º±1 (c=1,6, diméthylformamide)

Analyse : (produit séché à 73º)

$C_{24}H_{26}O_5N_4$ = 450,48 Calc. % : C 63,98 H 5,82 N 12,43

Tr. : 64,14 6,15 12,47

6. N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-glycine.

On dissous 600 mg (1,3 mM) d'ester éthylique de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-glycine dans 5 cc de méthanol et on ajoute 0,9 cc de soude 1,8 N. Après 1 heure 15' à

+ voir plus loin : Préparation des réactifs.

20º on neutralise avec la quantité équivalente d'HCl N. Le précipité est essoré, lavé à l'eau et désséché sur P_2O_5. On obtient 460 mg (rendement 82 %). On recristallise dans la pyridine ou le mélange pyridine/éther.

Fc : 216º-217,5º dec. (Litt. (195a) : 235º-240º)

$[\alpha]_D^{21}$ -5,7º±1 (c=1,9, acide acétique glac.) (Litt. (195a) : $[\alpha]_D^{20}$ - 5,5º (c=12,1 ac. acétique glacial).

Analyse : (produit séché à 100º)

$C_{23}H_{24}O_5N_4$ = 436,5 Calc. % : C 63,24 H 5,53 N 12,82

Tr. : 63,71 5,63 12,84

7. Chlorhydrate de la L-histidyl-glycine.

a) Hydrogénation à chaud en présence de noir de palladium.

On dissout 350 mg (0,8 mM) de N-cbz-N^{im}-L-histidyl-glycine dans 5 cc d'acide acétique à 80 %, en présence d'un équivalent d'HCl. La solution est soumise à l'hydrogénolyse en présence de noir de palladium à 20º pendant 2 heures : après ce temps, l'évolution de CO_2 est arrêtée, et on continue l'hydrogénation en chauffant à 50º : la scission du N^{im}-benzyle dans ces conditions est complète après 4 heures 30'. Par chromatographie sur papier, on révèle la présence, à côté du peptide libre (R_FI = 0,09) de deux autres taches beaucoup plus faibles dont la première, positive au réactif de Pauly et négative à la ninhydrine, a un R_FI de 0,17 et la seconde, positive à la ninhydrine et négative au réactif de Pauly, a un R_FI de 0,43 ; cette dernière se distingue de la tache correspondant au dérivé N^{im}-bzy-L-histidyl-glycine dont le R_FI est 0,31. Le produit obtenu après filtration, élimination du solvant et distillation répétée avec du méthanol absolu, est dissous dans le minimum d'eau et précipité par l'alcool. On obtient ainsi 125 mg de chlorhydrate de la L-histidyl-glycine et, par addition d'éther dans les eaux-mères, on sépare une seconde fraction de 15 mg (rendement total 70 %). Le dipeptide obtenu, examiné par chromatographie sur papier, mon-

tre une seule tache, positive à la ninhydrine et au réactif de Pauly.

b) Hydrogénation à température ordinaire en présence de palladium sur charbon

300 mg (0,7 mM) de N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-glycine, dissous dans 5 cc d'acide acétique 80 % en présence d'un équivalent de HCl N et de 200 mg de palladium sur charbon à 5 %, sont hydrogénés pendant 1 heure à température ordinaire. Après la fin du dégagement de CO_2, on ajoute de nouveau 200 mg de catalyseur et on prolonge l'hydrogénation pendant 30 heures. La chromatographie sur papier ne révèle pas alors de tache de dérivé secondaire. Le produit est ensuite traité comme précédemment. Rendement 110 mg (65 %)

Après séchage à 80º, le produit fond à 217,5º-218º (déc.)

$[\alpha]_D^{22}$ - 31,5º±2º (c=1,02, eau)

Analyse : $C_8H_{12}O_3N_4$, HCl, 1/2 H_2O = 257,67

Calc. % :	N 21,74	Cl 13,76	
Tr. :	21,73	13,73	

Après séchage à 110º et perte de poids correspondant à une demi molécule d'eau, le produit fond à 230º (déc.)

Analyse : $C_8H_{12}O_3N_4$, HCl = 248,67

Calc. % :	C 38,63	H 5,27	N 22,53
Tr. :	38,55	5,57	22,48

PHOTAKI et coll. (174) indiquent pour le chlorhydrate, sans molécule d'eau, préparé par une méthode différente, F = 217º-218º (déc.) et $[\alpha]_D^{22}$ - 33,6º±2º (c=1,01, eau). DAVIS (172) a décrit ce dipeptide comme chlorhydrate semihydrate avec F = 229º-230º mais avec un pouvoir rotatoire très différent : $[\alpha]_D^{20}$ - 8,43 (c=1, eau).

8. Ester méthylique de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-leucine

A une solution de L-leucinate de méthyle (obtenue à partir de 0,545 g (3 mM) de

son chlorhydrate*) dans 5 cc de pyridine sèche, on ajoute, sous refroidissement à -10º, 1,32 cc (1,5 mM) d'une solution refroidie de 1 cc de PCl_3 (fraichement redistillé sur diméthylaniline) dans 10 cc de pyridine. On laisse 30 minutes à température ordinaire et on ajoute en une seule fois 1,05 g (2,75 mM) de N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine. On chauffe 3 heures au bain de vapeur. La pyridine est évaporée et le résidu dissous à 40º dans l'acétate d'éthyle additionné d'eau. On filtre le précipité brun formé, et on lave 8 fois à l'eau, 4 fois au Na_2CO_3 10 % et de nouveau à l'eau jusqu'à neutralité. On sèche la solution d'acétate d'éthyle sur Na_2SO_4, on décolore par du norite et on concentre sous vide. Le résidu cristallin pèse 1,10 g (79 %). Après recristallisation dans le méthanol/eau on obtient 0,98 g d'un produit qui fond à 95º-105º. Par recristallisation de 510 mg dans l'acétate d'éthyle/éther de pétrole, on obtient une première fraction (210 mg) qui, après une nouvelle recristallisation, fond à 113º-113,5º. A partir des eaux-mères, on obtient une seconde fraction qui fond à 91,5º-92,5º. Le pouvoir rotatoire de la première fraction est $[\alpha]_D^{20}$ - 13,6º±1 . (c=3,2, acide acétique)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{28}H_{34}N_4O_5$ = 506,6

Calc. % : C 66,38 H 6,77 N 11,06

Tr. : 66,12 6,70 11,10

Un petit lot de ce produit, après saponification et hydrogénation en présence de Pd sur charbon, a donné une seule tache, positive à la ninhydrine et au réactif de Pauly ; son R_F dans différents solvants (R_FI = 0,33, R_FIII = 0,56) correspond à celui du peptide histidyl-leucine témoin. Ce dernier a été obtenu suivant la méthode de HOLLEY et SONDHEIMER (170) par couplage de l'azide de la N^{α}-cbz-L-histidine avec l'ester méthy-

*Le chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-leucine a été préparé suivant la méthode de BRENNER et HUBER (202) au $SOCl_2/CH_3OH$.

lique de la L-leucine, saponification de l'ester, et hydrogénation catalytique du produit obtenu.

B. SYNTHESE DU TETRAPEPTIDE C-TERMINAL DE L'ANGIOTENSINE

(suivant le schéma II, page 45 bis)

1. Ester méthylique de la N-cbz-L-prolyl-L-phénylalanine.

L'ester méthylique de la N-cbz-L-prolyl-L-phénylalanine a été obtenu par couplage de la N-cbz-L-proline* avec l'ester méthylique de la L-phénylalanine (préparé à partir de son chlorhydrate**) suivant la méthode des anhydrides mixtes, avec un rendement de 81 %. Le produit, obtenu sous forme d'huile comme dans les deux synthèses de ce dipeptide récemment décrites (42, 43a), a pu cependant être cristallisé après conservation a froid dans le dessicateur, et recristallisé ensuite dans l'acétate d'éthyle/hexane, sous forme de longues aiguilles fines Fc = 67º-68,5º

$[\alpha]_D^{18}$ - 27º±1º (c=4,85, diméthylformamide)

Analyse : (produit séché à 56º)

$C_{23}H_{26}O_5N_2$ = 373,3

Calc. % :	C 67,39	H 6,39	N 6,82
Tr. :	67,66	6,48	6,82

---

* La N-cbz-L-proline, préparée suivant ABDERHALDEN et NIENBURG (250), a été obtenue sous forme d'huile qui a cristallisé après ensemencement avec des cristeaux de ce produit, aimablement fournis par le Dr. B. ISELIN

** La chlorhydrate de l'ester méthylique de la L-phénylalanine a été préparé selon la méthode de BRENNER et HUBER (202)

2. Bromhydrate de l'ester méthylique de la L-prolyl-L-phénylalanine.

On met en suspension 2,05 g (5 mM) d'ester méthylique de la N-cbz-L-prolyl-L-phénylalanine dans 4,5 cc d'une solution 3,5 N d'HBr dans l'acide acétique glacial et on laisse pendant 30 minutes à 23º. On précipite à l'éther et on triture le précipité en renouvelant plusieurs fois l'éther. On obtient 1,4 g de bromhydrate (rendement 78 %) chromatographiquement pur. On cristallise dans méthanol/éther Fc = 169,5º-170,5º $[\alpha]_D^{19}$ - 37º±1º (c=2,08, eau) (calculé sur la base libre -47,8º)
Litt. (42) pour le chlorhydrate $[\alpha]_D^{25}$ - 41,8º (c=2,5, eau) (calculé sur la base libre - 47,3º) et (43a) : $[\alpha]_D^{23}$ - 41º±1º (c=4,15, eau) (calculé sur la base libre -46,4º)
Analyse : (produit séché à 80º)

Calc. % :	C 50,38	H 5,92	N 7,84	OCH_3 8,67
Tr. :	50,69	5,92	8,15	8,19

3. Ester méthylique de la N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine.

A une suspension de 3,6 g (10 mM) de bromhydrate d'ester méthylique de la L-prolyl-L-phénylalanine dans 10 cc de diéthylphosphite, on ajoute sous refroidissement 2,8 cc de triéthylamine (30 mM), puis 1,25 cc (10 mM) d'o-phénylènechlorophosphite*. Après un chauffage de 5 minutes au bain de vapeur, on ajoute par portions 3,8 g (10 mM) de N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidine et on chauffe le mélange pendant encore 45 minutes. Après refroidissement, on précipite les produits de la réaction par addition d'hexane et on triture le précipité. Celui-ci est dissous dans un mélange acétate d'éthyle/eau et le pH est ajusté à 7 ; la solution est lavée 7 fois à l'eau, puis abondamment avec une solution de CO_3Na_2 à 10 %, et de nouveau à l'eau jusqu'à neutralité. La solution est désséchée sur Na_2SO_4, décolorée par du norite, et le solvant est évaporé sous vide.

---

* voir plus loin : Préparation des réactifs.

Par précipitation avec benzène/hexane, on obtient 4,75 g d'ester méthylique de N-cbz-N^{im}-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine (rendement 72 %). On recristallise dans le mélange benzène/hexane. $F_{inst.}$: 71º $[\alpha]_D^{19}$ - 27º±1º (c=2,7, diméthylformamide)

Analyse : (produit séché à 40º)

$C_{36}H_{39}O_6N_5$, 1,21 H_2O = 659,49

Calc. % :	C 65,55	H 6,33	N 10,62
Tr. :	65,78	6,23	10,78

Dosage d'eau selon Fischer : 3,3 %

4. Dibromhydrate de l'ester méthylique de la N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine.

4,45 g (7 mM) d'ester méthylique de N^{α}-cbz-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine en suspension dans 10,5 cc d'une solution 3,5 N d'HBr dans l'acide acétique glacial sont agités pendant 50 minutes à la température ordinaire. On refroidit la solution à 0º et on précipite le dibomhydrate par l'éther sec ; le précipité est trituré en renouvelant plusieurs fois l'éther ; on obtient ainsi 4,37 g (rendement 94 %). On recristallise dans le méthanol/éther Fc : 199º-201º déc. (ramoll. à 190º)

$[\alpha]_D^{21}$ - 23,3º±1º (c=2,9, eau)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{28}H_{33}O_4N_5$, 2 HBr = 665,46

Calc. % :	C 50,54	H 5,30	N 10,53	Br 24,01
Tr. :	50,24	5,22	10,49	23,90

5. Ester méthylique de la N-cbz-L-valyl-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine.

On dissout 0,75 g (3 mM) de N-cbz-L-valine* dans du tétrahydrofuranne sec qu'on refroidit à -5º et on y ajoute 0,43 cc de triéthylamine et ensuite 0,4 cc (3 mM) de

---

* La N-cbz-L-valine a été préparée suivant VAUGHAN et EICHLER (145b) et cristallisée dans l'acétate d'éthyle/hexane.

chlorocarbonate d'isobutyle. Après 10 minutes à -5º, on y ajoute une solution d'ester méthylique de N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine, préparée préalablement à partir de 2 g (3 mM) de dibromhydrate et de 0,86 cc (6 mM) de triéthylamine dans le tétrahydrofuranne sec. On laisse le mélange pendant 3 heures à la température ordinaire sous agitation, et ensuite on chauffe à reflux pendant 5 minutes à 50º. On évapore le tétrahydrofuranne sous vide et on dissout le résidu dans l'acétate d'éthyle. La solution est lavée 5 fois à l'eau, 2 fois avec une solution d'ammoniaque N et 3 fois à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 anhydre, évaporée sous vide ; on cristallise le produit dans le benzène/hexane. On obtient 1,9 g d'ester méthylique de la N-cbz-L-valyl-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine (rendement 82,5 %). On recristallise dans benzène/hexane $F_{inst.}$: 78º

$[\alpha]_D^{22}$ - 32,2º±2º (c=1,04, diméthylformamide)

Analyse : (produit séché à 40º)

$C_{41}H_{48}O_7N_6$, 1,75 H_2O = 768,34

Calc. % :	C 64,08	H 6,75	N 10,93
Tr. :	64,59	6,40	11,06

Dosage d'eau selon Fischer : 4,1 %

6. Dibromhydrate de l'ester méthylique de la L-valyl-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine.

450 mg d'ester méthylique de la N-cbz-L-valyl-N^{im}-bzy-L-histidyl-L-prolyl-L-phénylalanine (0,6 mM) sont mis en suspension dans 1,5 cc de HBr 3,5 N dans l'acide acétique glacial et sont agités pendant 2 heures à température ordinaire. On ajoute après refroidissement à 0º, de l'éther sec, et le dibromhydrate obtenu est trituré plusieurs fois avec de l'éther. On obtient 400 mg (rendement 81 %). On recristallise dans méthanol/acétone/éther. Le produit recristallisé est très hygroscopique.

F = 153º-157º

$[\alpha]_D^{20}$ - 30,4º±1º (c=2,4, eau)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{33}H_{42}O_5N_6$, 2 HBr = 764,5

Calc. % : N 10,99 Br 20,90

Tr. : 10,22 20,02

C. SYNTHESE DE PEPTIDES DE LA SEQUENCE N-TERMINALE DU TRYPSINOGENE.

a. Dérivés du tripeptide L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine

1. Ester benzylique de la N-cbz-L-isoleucyl-L-valine

A une solution de 10,46 g (39,4 mM) de N-cbz-L-isoleucine* dans 30 cc de tétrahydrofuranne sec, refroidie à -10º, on ajoute sous agitation 5,6 cc (39,4 mM) de triethylamine et ensuite 3,75 cc (39,4 mM) de chlorocarbonate d'éthyle, fraichement distillé. Après 30 minutes d'agitation à cette température, on y ajoute une solution d'ester benzylique de L-valine dans 15 cc de tétrahydrofuranne(préparée préalablement à partir de 9,8 g (40 mM) de son chlorhydrate* avec une solution chloroformique d'ammoniac sec, selon HILLMANN (249)). On laisse le mélange sous agitation 1 heure à 0º, 4 heures à température ordinaire, on le chauffe pendant 3 minutes à reflux et on le refroidit ensuite immédiatement à 0º. On évapore le solvant sous vide et on extrait le résidu avec de l'acétate d'éthyle. Les extraits sont lavés 2 fois avec une solution d'HCl à 2 %, 2 fois à l'eau, 2 fois avec une solution de $NaHCO_3$ à 3 % et ensuite à l'eau jusqu'à neutralité. L'examen des eaux de lavages et de la solution d'acétate d'éthyle, par chromatographie sur papier, montre qu'après les 4 premiers lavages, toute trace d'ester benzylique de la L-valine (R_FIII 0,85, révélation à la ninhydrine), et après

---

* voir ci-après : Préparation des dérivés des acides aminés.

les lavages alcalins, toute trace de N-cbz-isoleucine (R_FII 0,72, révélation à la β-methylombelliférone) sont éliminées.

La solution dans l'acétate d'éthyle, séchée sur Na_2SO_4 anhydre et ensuite évaporée sous vide, a donné un précipité solide. Ce précipité, redissous dans une petite quantité d'acétate d'éthyle en chauffant légèrement, cristallise après addition d'hexane sec, refroidissement et frottement des parois du récipient avec une baguette sous forme d'aiguilles fines. On essore les cristeaux, on les lave à l'hexane sec et on les sèche sous vide sur des copeaux de paraffine. On obtient ainsi 11,67 g d'ester benzylique de N-cbz-L-isoleucyl-L-valine, Fc = 120º-121º. En concentrant les eaux-mères, on obtient une seconde fraction de 1,65 g, Fc = 118,5º-120,5º. Rendement total 74 %. Recristallisation dans l'acétate d'éthyle/hexane : Fc = 121º-122º

$[\alpha]_D^{20}$ - 9,7º±2º (c=0,98, diméthylformamide) R_FI = 0,96 (révélé au chlore)

Analyse (produit séché à 60º)

$C_{26}H_{34}O_5N_2$ = 454,5	Calc. % :	C 68,69	H 7,54	N 6,16
	Tr. :	69,14	7,74	6,16

2. Bromhydrate de l'ester benzylique de la L-isoleucyl-L-valine

Pour déterminer les conditions optima de la scission sélective du groupement carbobenzoxy de l'ester benzylique de la N-cbz-L-isoleucyl-L-valine, on a effectué une série d'essais d'acidolyse de ce dérivé par l'acide bromhydrique dissous dans l'acide acétique glacial, à différentes concentrations (N, 2N et 3,5 N), en variant la durée et la température de la réaction.

Des prises d'essais, examinées par chromatographie sur papier, ont permis de suivre la scission du groupement carbobenzoxy et l'intervention éventuelle de réactions secondaires (scission d'ester benzylique et de la liaison peptidique). En voici un exemple : on met en suspension 0,91 g (2 mM) d'ester benzylique de N-cbz-L-isoleucyl-L-valine dans 1,7 cc (3 équiv.) d'une solution 2N de HBr/CH_3COOH fraichement pré-

parée? Après 2 heures à 22º sous agitation, on ajoute, sous refroidissement, de l'éther anhydre. Il se forme immédiatement un produit solide blanc que l'on lave plusieurs fois, en renouvelant l'éther par décantation. On obtient ainsi 0,72 g (rendement 90,5 %) d'un produit sec non hygroscopique. La chromatographie sur papier montre la présence, à côté de la tache de l'ester benzylique de l'isoleucyl-valine (R_FIII 0,90, coloration violet-gris), une très faible tache d'isoleucyl-valine (R_FIII 0,74, coloration rose). On recristallise dans méthanol/éther, Fc = 144,5º-146º (rémoll. à 141º)

$[\alpha]_D^{20}$ - 21,3º±1º (c=2,06, eau)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{18}H_{29}O_3N_2Br$ = 401,35 Calc. % : C 53,86 H 7,28 N 6,98

Tr. : 54,08 7,42 6,72

3. Ester benzylique de la N^{α}-cbz,N^{ε}-tos-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine

A une suspension de 2 g (5 mM) de bromhydrate d'ester benzylique de la L-isoleucyl-L-valine dans 4 cc de diethylphosphite, on ajoute sous refroidissement 1,41 cc (10 ml) de triethylamine, puis 0,71 cc d'o-phénylènechlorophosphite ; le mélange s'échauffe et les sels de triethylamine précipitent ; on chauffe pendant 5 minutes à 100º à reflux, et on ajoute en portions, sous forme de poudre, 2,17 g (5 mM) de N^{α}-cbz,N^{ε}-tos-L-lysine* ; on continue à chauffer en agitant, pendant 40 minutes ; le gaz HCl s'échappe à travers le tube de garde rempli de $CaCl_2$. Après refroidissement, on précipite le peptide par addition d'hexane (dans lequel le diethylphosphite est soluble, et on triture le précipité avec ce solvant. On lave le précipité abondamment avec une solution de $NaHCO_3$ à 3 %, ensuite avec de l'eau. On obtient ainsi 3,2 g d'un produit brut (r. 87,4 %) coloré en rose qui, par chromatographie sur papier, montre une seule tache (R_FI 0,96) révélée au chlore (les taches correspondant à la N^{α}-cbz-N^{ε}-tos-lysine

---

* voir ci-après : Préparation des dérivés des acides aminés.

(R_FII 0,73) et à l'ester benzylique de l'isoleucyl-valine (R_FIII 0,90) se révèlent dans les chromatogrammes des eaux de lavage seulement). Le produit brut est dissous dans de l'acétate d'éthyle, et la solution refroidie est lavée rapidement avec une solution de Na_2CO_3 à 5 %, puis à l'eau jusqu'à neutralité, séchée sur Na_2SO_4 et décolorée par du Norite. Par évaporation du solvant sous vide, on obtient une huile qui, dissoute dans l'acétate d'éthyle, cristallise par addition d'éther de pétrole, 2,66 g (rend. 73 %), Fc = 144º-146º. Par recristallisation dans l'acétate d'éthyle/hexane, on obtient de très fines aiguilles d'ester benzylique de N^{α}-cbz-N^{ε}-tos-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine Fc = 149º-150º $[\alpha]_D^{20}$ - 10,3º±2 (c=0,97, diméthylformamide)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{39}H_{52}O_8N_4S$ = 736,6 Calc. % : C 63,56 H 7,11 N 7,60

Tr. : 63,74 7,13 7,63

4. Bromhydrate de l'ester benzylique de la N^{ε}-tos-L-valyl-L-isoleucyl-L-valine

Ce dérivé est obtenu suivant le mode opératoire indiqué précédemment pour la préparation du dérivé 2 : après 1 h. 30' (HBr/CH_3COOH 3N) on obtient, après addition d'éther sec, une huile. Par trituration, renouvellement de l'éther, et après une nuit à la glacière, le bromhydrate de l'ester benzylique de la N^{ε}-tos-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine cristallise sous forme de longues aiguilles en rosace Fc = 173º-176º (rendement 65 %). On recristallise dans le méthanol/éther. Chromatographie sur papier : une seule tache, R_FIII 0,94 Fc = 188,5º-190,5º déc. $[\alpha]_D^{20}$-18º±2º (c=0,99, méthanol)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{31}H_{47}O_6N_4S$ Br = 683,89 Calc. % : C 54,45 H 6,92 N 8,19

Tr. : 54,51 7,16 8,06

b. Dérivés du tétrapeptide α-L-valyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine

1. Ester méthylique de l'α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine

Ce dérivé est obtenu par la méthode aux anhydrides mixtes, suivant le mode opératoire décrit précédemment pour la préparation de l'ester benzylique de la N-cbz-L-isoleucyl-L-valine : le couplage de la N-cbz-L-valine* (2,51 g, 10 mM) avec l'ester méthylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine (obtenu à partir de 3,63 g (11 mM) de son chlorhydrate*) est effectué dans le tétrahydrofuranne avec du chlorocarbonate d'isobutyle. Le produit obtenu sous forme d'huile épaisse est dissous dans l'acétate d'éthyle et, après addition d'éther de pétrole, cristallise à la glacière, sous forme de prismes microscopiques. On obtient ainsi 3,92 g d'ester méthylique de l'α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine (rend. 74,3 %) Fc = 119º-122º. Par chromatographie sur papier, on révèle au chlore une seule tache, R_F III 0,94. On recristallise dans l'acétate d'éthyle/hexane. Fc = 123-125º (ramoll. 111º). $[\alpha]_D^{20}$ - 15,4º±1º (c=2,9 ; ac. acétique glac.)

Analyse : (produit séché à 60º)

$C_{28}H_{37}O_7N_3$ = 527,6 Calc. % : C 63,73 H 7,06 N 7,96

Tr. : 64,01 7,23 7,85

2. α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine

On dissout 3,7 g (7 mM) d'ester méthylique de l'α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine dans 25 cc de méthanol et on ajoute 3,9 cc (7,8 mM) de soude 2N. Après 5 heures à 22º, on neutralise avec de l'HCl 1N. L'α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine est obtenue sous forme de poudre cristalline : 3 g (rend. 82 %) Fc 122º-123º

$[\alpha]_D^{20}$ - 19,1º±1º (c=2,56 ; 0,1 NaOH)

Par chromatographie sur papier, on révèle une seule tache par la méthode au chlore

---

* voir ci-après : Préparation des dérivés des acides aminés.

(R_FI 0,90) et par la méthode à l'ombelliferone (R_FII 0,78)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{27}H_{35}O_7N_3$ = 513,5 Calc. % : C 63,15 H 6,87 N 8,18

Tr. : 63,0 6,60 7,93

3. α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysyl-L-isoleucyl-L-valine benzyl-ester

A une solution de 1,28 g (2,5 mM) d'α-(N-cbz-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine et d'ester benzylique de la L-isoleucyl-L-valine (obtenu à partir de 1,05 (2,65 mM) de bromhydrate suivant la méthode de HILLMANN (246)) dans 10 cc de tétrahydrofuranne, on ajoute, sous refroidissement, 0,57 g de dicyclohexyl-carbodiimide : on agite le mélange pendant 4 heures à 4º et pendant une nuit à la température ordinaire ; on essore les cristeaux de dicyclohexylurée formée, on évapore le filtrat sous vide à sec et on dissout le résidu dans l'acétate d'éthyle. Cette solution est lavée 2 fois par HCl 1N, 3 fois par NH_4OH 1N et par l'eau saturée de NaCl. Par chromatographie sur papier, on révèle, dans les eaux de lavage, de l'ester benzylique de l'isoleucyl-valine (R_FIII 0,89) mais pas d'α-(N-cbz-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine (R_FII 0,78), et dans la solution d'acétate d'éthyle lavée, une seule tache R_FI 0,90) par la méthode au chlore. On sèche sur Na_2SO_4 et on évapore sous vide l'acétate d'éthyle. On triture le résidu obtenu avec de l'éther de pétrole : le produit se solidifie après un séjour à la glacière ; redissous dans l'acétate d'éthyle et reprécipité par l'hexane, il donne 1,52 g d'ester benzylique de l'α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysyl-L-isoleucyl-L-valine (rendement 76 %) . On recristallise dans acétate d'éthyle/hexane, Fc 78-82º ramoll. 72º $[\alpha]_D^{20}$ - 17,9º±1º (c=1,23 ; ac. acétique glac.) et - 0,8º±2º (c=1,2 ; diméthylformamide)

4. α-(L-valyl)-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine, HCl

On dissout 815 mg (1 mM) d'ester benzylique de l'α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysyl-L-isoleucyl-L-valine dans 60 cc d'acide acétique à 80 % et on ajoute 1 cc d'HCl N et 1 g de noir de palladium. On soumet la solution à l'hydrogénation catalytique à vase ouvert et on contrôle la marche de la réaction par le dégagement de CO_2. Après 20 heures d'hydrogénation, on ajoute 10 cc d'eau pour dissoudre le précipité formé et 0,5 g de noir de palladium, et on continue l'opération pendant encore 5 heures. On sépare le catalyseur par filtration, et après évaporation sous vide, addition d'eau et nouvelle évaporation sous vide, on obtient 321 mg de chlorhydrate d'α-(L-valyl)-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine (rend. 70 %). [Fc 240° déc.] Par chromatographie sur papier, on obtient une seule tache, R_FI 0,41 et R_FIII 0,49. Par hydrolyse totale d'une partie aliquote avec HCl 6N à 110°, pendant 24 heures en tube scellé, on obtient, après chromatographie sur papier, 3 taches à la ninhydrine correspondant à la lysine, à la valine et à l'isoleucine, la tache de la valine ayant une coloration environ double en intensité par rapport à la tache de la lysine et à celle de l'isoleucine.

Pour recristalliser, on dissout le produit obtenu dans du méthanol à chaud et on le précipite par l'éther sous forme d'une masse gélatineuse qui, après un séjour à la glacière, se solidifie. Fc 246°déc. [$[\alpha]_D^{20}$ - 53,2°±2° (c=1,28, eau) et -35°±2° (c=1,35 ; méthanol)]

Analyse : (produit séché à 80°)

$C_{22}H_{44}O_5N_5Cl$ = 494,1 Calc. % : C 53,48 H 8,98 N 14,17

Tr. : 53,22 8,97 14,18

Hydrolyse par la trypsine du tétrapeptide α-(L-valyl)-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine

Pour contrôler la configuration stéréochimique du résidu lysyle et déceler la présence éventuelle d'un diastéréoïsomère du tétrapeptide α-(L-valyl)-L-lysyl-L-isoleucyl-L-valine dans le produit obtenu après recristallisation, nous avons soumis une partie aliquote de ce dernier à l'action de la trypsine, qui doit hydrolyser uniquement

la liaison -L-lysyl-isoleucyl- et laisser intacte la liaison -D-lysyl-L-isoleucyl- éventuellement présente.

Les essais enzymatiques ont été effectués par incubation à 37º et à pH 7,8 dans un mélange tampon de phosphates à 0,03 M ; la concentration en substrat (tétrapeptide) était 0,025 M et celle de la trypsine* 0,05 mg par cc. Des prises d'essais ont été examinées par chromatographie sur papier. Les taches correspondant aux produits de la digestion du tétrapeptide ont été identifiées par comparaison avec les taches des témoins valyl-lysine et isoleucyl-valine obtenus par hydrogénation catalytique des parties aliquotes des dérivés α-(N-cbz-L-valyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine et N-cbz-L-isoleucyl-L-valine décrits précédemment.

Ces essais ont montré qu'après 6 heures d'incubation, la coupure du tétrapeptide α-(valyl)-lysyl-isoleucyl-valine était complète.

Voici les valeurs R_F dans les mélanges I et III (voir TABLEAU VIII, p. 79 bis) du tétrapeptide α-(valyl)-lysyl-isoleucyl-valine et des produits de sa digestion par la trypsine, α-(valyl)-lysine et isoleucyl-valine :

	R_F I	R_F III
α-(Val)-Lys.Ileu-Val	0,41	0,59
α-(Val)-Lys	0,15	0,21
Ileu-Val	0,71	0,75

---

* Provenance : Worthington, Biochemical Corporation, Freehold, N.J., U.S.A. Trypsine 2 x recristallisée contenant approximativement 50 % de $MgSO_4$.

Ester méthylique de la N-cbz-L-isoleucyl-L-valine

La préparation de ce dérivé a été faite par couplage de la N-cbz-L-isoleucine* avec l'ester méthylique de la L-valine (obtenu à partir de son chlorhydrate*), dans le tétrahydrofuranne, suivant la méthode de SHEEHAN et HESS (122) à la dicyclohexylcarbodiimide : rendement de 68,5 % Fc 130º-131º $[\alpha]_D^{20}$ -2,8°±2° (c=1,42 ; diméthylformamide) R_FI 0,94 (révélation au chlore)

N-cbz-L-isoleucyl-L-valine

Des essais de saponification de l'ester méthylique à la température ordinaire, par 1,2 équivalent d'alcali dans le méthanol, ont montré que l'hydrolyse était partielle, même après prolongation de la réaction pendant 12 heures.

On obtient la N-cbz-L-isoleucyl-L-valine avec un rendement de 68 à 72 % après une saponification de 48 à 60 heures à la température ordinaire, avec 2 équivalents d'alcali. Fc 144º-145º $[\alpha]_D^{20}$ -50º±2º (c=0,92 ; 0,1 NaOH) R_FII 0,76 (révélation à la β-méthylombelliférone)

C. Peptides de l'acide-L-aspartique

1. α-(N-cbz-β-O-bensyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester

A une solution de 1,87 g (5 mM) de β-benzyl-ester de l'acide N-cbz-L-aspartique* dans 10 ml de THF anhydre, on ajoute, après refroidissement à -5º et sous agitation, 0,71 cc (5 mM) de triéthylamine, puis 0,48 cc (5 mM) de chlorocarbonate d'éthyle. On laisse le mélange pendant 15 minutes à cette température, et ensuite on ajoute une solution refroidie d'ester méthylique de N^{ε}-cbz-L-lysine dans le tétrahydrofuranne (préparée à partir de 2 g (6 mM) de son chlorhydrate*). On agite le mélange pendant

---

*voir ci-après : Préparation des dérivés des acides aminés.

40 minutes à cette température, puis pendant la nuit à température ordinaire. Après évaporation du solvant sous vide, à température ordinaire, on extrait le résidu par l'acétate d'éthyle (environ 300 ml). Cette solution est lavée trois fois avec HCl N, 2 fois à l'eau, 2 fois avec une solution de $NaHCO_3$ à 3 % et de nouveau à l'eau ; après ces lavages, la solution d'acétate d'éthyle, examinée par chromatographie sur papier, ne montrait plus de taches ni d'ester méthylique de N^{ε}-cbz-lysine (R_FIII 0,88), ni d'ester β-benzylique de l'acide N-cbz-aspartique (R_FII 0,72), présentes dans les eaux de lavages acides et alcalines respectivement.

Cette solution, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous vide, laisse un résidu solide de 2,74 g. Fc 118º-121º. Le produit brut, dissous dans un petit volume d'acétate d'éthyle par léger chauffage, donne, après addition d'éther de pétrole, un précipité floconneux d'α-(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester : 2,38 g (rend. 70,5 %) Fc 125º-126º. On recristallise dans l'acétate d'éthyle/hexane Fc 126º-127º $[\alpha]_D^{20}$ + 21,3° ± 1° (c = 1,76 ; chloroforme).

Analyse : (produit séché à 60º)

$C_{34}H_{39}O_9N_3$ = 633,7 Calc. % : C 64,44 H 6,23 N 6,63

Tr. : 64,90 6,47 6,89

2. α-(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine amide

Ce dérivé a été préparé suivant la même méthode que le dérivé précédent, à la seule différence étant qu'à la place de l'ester méthylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine on a utilisé son amide*, et le chlorocarbonate d'isobutyle à la palce du chlorocarbonate d'éthyle. Le produit brut, dissous dans le méthanol anhydre, précipite sous forme de flocons par addition d'eau et frottement avec une baguette. On obtient une première fraction de 1,7 g, Fc 130º-133º (rétrécissement à 125º), et une deuxième fraction

---

*voir ci-après : Préparation des dérivés des acides aminés.

de 0,3 g, Fc 116º-120º. On cristallise la première fraction dans le méthanol/éther de pétrole ; on obtient 1,05 g de α-(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine amide Fc 133º-135º, recristallisation dans l'éthanol/hexane Fc 137º-139º $[\alpha]_D^{20}$ - 8,0° ± 1° (c = 1,88 ; dimethylformamide).

Analyse : (produit séché à 60º)

$C_{33}H_{38}O_8N_4$ = 618,7 Calc. % : C 64,0 N 6,19 N 9,05

Tr. : 64,19 6,41 9,09

3. α-(α-L-aspartyl)-L-lysine methyl-ester, chlorhydrate

0,4 g (0,61 mM) du dérivé précédent ont été dissous dans 20 ml d'acide acétique glacial dans lesquels ont été ajoutés 0,62 cc d'HCl N (1 équivalent), 3 cc d'eau et environ 0,5 g de noir de palladium. L'hydrogénation ctatlytique a été continuée pendant encore une heure après l'arrêt du dégagement de CO_2. Le sirop obtenu après séparation du catalyseur et évaporation du solvant, dissous dans le méthanol anhydre, est précipité par de l'éther absolu ; on obtient un produit déliquescent difficile à manipuler en raison de son hygroscopicité ; mis en suspension dans l'acétone sèche, lavé plusieurs fois par centrifugation et décantation, il est transporté encore humide dans le dessiccateur et séché sur H_2SO_4 concentré. On obtient ainsi environ 100 mg de chlorhydrate d'α-(α-L-aspartyl)-L-lysine methyl-ester, sous forme d'une poudre cristalline hygroscopique.

L'examen par chromatographie sur papier montre la présence d'une seule tache positive à la ninhydrine, R_FIII 0,17, située entre la tache correspondant à l'acide aspartique (R_FIII 0,12) et celle de l'ester méthylique de la lysine (R_FIII 0,31).

Avec l'espoir d'obtenir un produit moins hygroscopique, nous avons essayé de préparer l'acétate de l'α-(α-L-aspartyl)-L-lysine methyl-ester en effectuant l'hydrogénolyse d'un lot de la même préparation d'α-(N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester, sans ajouter cette fois d'acide chlorhydrique.

Le produit obtenu après l'hydrogénation, effectuée dans les mêmes conditions

que précédemment, examiné par chromatographie sur papier, a montré cette fois la présence de deux taches positives à la ninhydrine ; une première (R_FIII 0,19) qui correspondait à l'aspartyl-lysine methyl-ester, et une seconde de R_FIII 0,42, aussi importante que la première. L'intensité de coloration de cette dernière ne diminuait pas en prolongeant l'hydrogénation après addition de catalyseur frais (ce qui exclut l'éventualité de la présence d'ester benzylique de ce dérivé). Par contre, la conservation en solution du mélange obtenu après l'hydrogénation catalytique conduit à l'augmentation de l'intensité de la deuxième tache (R_F 0,42) au dépens de la première qui correspond à l'aspartyl-lysine methyl-ester.

Par chromatographie sur papier préparative et élution séparée des taches, nous avons obtenu de petites quantités de chacun de ces deux produits ; l'hydrolyse totale de parties aliquotes avec HCl 6N à 110º pendant 8 heures, et l'examen, par chromatographie sur papier, des produits d'hydrolyse, ont montré la présence d'acide aspartique et de lysine en quantités pratiquement égales dans les deux produits. Pour déterminer, d'autre part, si les fonctions α et ε-amine étaient toutes les deux libres dans le cas du dérivé secondaire (R_FIII 0,42), nous avons préparé les dérivés dinitrophényle (DNP) de ces deux produits. Ces dérivés ont été obtenus par l'action du 1,2,4-dinitrofluorobenzène (provenance : Fluka A.G., Buchs, Suisse) en présence de $NaHCO_3$ d'après la méthode de SANGER (251) et la technique d'ELLIOTT et PEART (252). Les dérivés DNP ainsi préparés ont été soumis à l'hydrolyse totale (HCL 6N, température 105º, 12 heures), et traités de la manière habituelle pour séparer les DNP-aminoacides étherosolubles de ceux qui restent dans la phase aqueuse acide. L'examen par chromatographie sur papier Schleicher et Schüll 507 dans le mélange phénol, alcool isoamylique, eau (1:1:1) et la comparaison avec les DNP-aminoacides témoins (acide DNP-aspartique et N^{ε}-DNP-lysine préparée selon PORTER et SANGER (253), a montré que le produit principal donnait de l'acide DNP-aspartique (R_F 0,04 dans le mélange phénol/alcool isoamylique/eau) et de la N^{ε}-DNP-lysine (R_FI 0,55), ce qui

confirme la structure d'α-(aspartyl)-lysine methyl-ester pour ce produit. Par contre, le dérivé secondaire n'a pratiquement pas donné d'acide DNP-aspartique mais uniquement de la N^{ε}-DNP-lysine, ce qui est en faveur d'une structure de dicétopipérazine d'aspartyl-lysine par cyclisation d'aspartyl-lysine methyl-ester en absence d'un équivalent d'acide chlorhydrique. D'autre part, l'électrophorèse sur papier sous 670 volts et à pH 5,6 (tampon acétate de pyridine 0,05 M) a montré que le produit secondaire se comportait à ce pH comme une substance pratiquement neutre (pour la discussion de ces résultats voir p. 73-75).

4. Diester benzylique de l'acide N-cbz-L-valyl- aspartique

La préparation de ce dérivé a été effectuée par couplage de la N-cbz-L-valine* avec l'ester dibenzylique de l'acide aspartique* suivant la méthode des anhydrides mixtes au chlorocarbonate d'isobutyle décrite précédemment. On obtient un dérivé cristallisé, avec un rendement de 77%; on recristallise dans l'éthanol/eau, sous forme d'aiguilles Fc 108º-110º

Analyse : (produit séché à 60º)

$C_{31}H_{34}O_7N_2$ = 546,6	Calc. % :	C 68,11	H 6,26	N 5,12
	Tr. :	68,71	5,91	5,0

5. Acide L-valyl -aspartique

Le dérivé précédent dissous dans l'acide acétique à 80%, soumis à l'hydrogénolyse (H_2/Pd noir), a donné en une seule opération l'acide L-valyl-L-aspartique avec un rendement de 83%. Le peptide ainsi obtenu, examiné par chromatographie sur papier, a donné une seule tache, positive à la ninhydrine, R_FIII 0,31, située entre la tache correspondant à l'acide aspartique, R_FIII 0,12 et celle de la valine R_FIII 0,42

Fc 201º-203º déc.

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_9H_{16}O_5N_2$ = 232,2	Calc. % :	C 46,54	H 6,94	N 12,06
	Tr. :	46,10	7,11	12,32

---

* voir ci-après : Préparation des dérivés des acides aminés.

α-(N-cbz-glycyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester

Ce dérivé est préparé suivant la méthode utilisée pour la préparation de l'α-(α-N-cbz-β-O-benzyl-L-aspartyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester, décrite précédemment. Il est obtenu sous forme d'aiguilles prismatiques, avec un rendement de 59 %. Fc 93º. On recristallise dans l'acétate d'éthyle/hexane Fc 96º-97º (Litt. (139a) Fc 97-98º).

α-(cbz-glycyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine amide

0,93 g du dérivé précédent sont dissous dans 100 cc de méthanol anhydre saturé de NH_3 sec ; la solution, conservée pendant 3 jours à la température ordinaire, dans un flacon à pression hermétiquement bouché, a donné un produit solide après évaporation du solvant. Ce produit, dissous de nouveau dans le méthanol, est précipité par l'éther sec. On obtient ainsi 0,53 g d'α-(cbz-glycyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine amide, Fc 137º-140º (rétrécissement à 125º) Litt. (15b) 130º-134º

α-glycyl-lysine methyl-ester, chlorhydrate

Par hydrogénation catalytique du dérivé α-(N-cbz-glycyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester dissous dans le méthanol et en présence de deux équivalents d'HCl, on obtient un produit très hygroscopique qui, conservé dans le dessiccateur, se transforme en une masse vitreuse.

Par chromatographie sur papier, on obtient une seule tache, positive à la ninhydrine (coloration jaune qui vire au violet-gris), de R_FIII 0,28, située entre la tache correspondant à la glycine (R_FIII 0,17) et celle de l'ester méthylique de la lysine (R_FIII 0,31).

Par action d'une solution d'HBr/CH_3COOH 3,5 N sur l'α-(N-cbz-glycyl)-L-(N^{ε}-cbz)-lysine methyl-ester à 22º pendant 1 heure, on obtient le dibromhydrate d'α-glycyl-lysine methyl-ester sous forme d'un produit déliquescent.

d. Préparation des dérivés des acides aminés

1. N-carbobenzoxy-L-isoleucine

La carbobenzoxylation de l'isoleucine a été effectuée suivant la méthode générale de BERGMANN et ZERVAS (13) : à une solution de 13,1 g (0,1 M) de L-isoleucine* dans 25 cc de NaOH 4N (0,1 mM), refroidie par un mélange glace/eau, on ajoute, sous agitation vigoureuse, en 5 portions égales, au total 20 cc (=24 g = 0,14 mM) de chlorure de carbobenzoxy** et 75 cc de NaOH 2N. L'opération dure 2 heures, on contrôle pendant ce temps le pH du mélange avec du papier-indicateur de pH et on ajoute de l'alcali pour conserver pendant ce temps une réaction légèrement alcaline. On continue l'agitation encore 1 heure, et ensuite on extrait la solution alcaline avec 2 fois 30 cc d'éther pour éliminer l'excès de chlorure de carbobenzoxy et les produits de sa décomposition. On acidifie la solution aqueuse sous refroidissement et agitation, en ajoutant HCl 5N jusqu'à réaction Congo positive. On extrait l'huile qui se forme par l'éther. La solution éthérée, après lavage à l'eau, est desséchée sur Na_2SO_4 anhydre. Après évaporation de l'éther, il reste une huile claire qui, après plusieurs mois de séjour à la glacière, dans le dessiccateur sur P_2O_5, reste inchangée. Nous avons obtenu 22,5 g de N-cbz-L-isoleucine (85 %), R_FII 0,73 (révélation à la β-méthylombelliférone).

2. N-cbz-L-valine

La préparation de ce dérivé a été faite de la même amnière que pour le dérivé précédent. L'huile obtenue, conservée pendant quelques jours dans le dessiccateur sur P_2O_5, et à -20º, commence à montrer des "points" de cristallisation distincts ;

---

* Chromatographiquement pure, ne contenant pas d'isomère allo, $[\alpha]_D^{19}$ -40º (C=2 6N HCl) ; provenance : Mann Research Laboratories, New-York

** voir ci-après : Préparation des réactifs.

en ajoutant de l'hexane et en triturant avec une baguette, on obtient la cristallisation de la totalité de la masse visqueuse après un séjour à la glacière, Fc 58-59º Recristallisation dans le benzène/hexane et l'acétate d'éthyle/hexane, Fc 59-61º Litt. (145b): 59-61º R_FII 0,77 (révélation à la β-méthylombelliférone)
$[\alpha]_D^{20}$ - 4,1º±2,5º (c=1,90 ; ac. acétique glacial)

N$^{\varepsilon}$-tosyl-L-lysine

Nous avons obtenu ce dérivé en utilisant la méthode décrite par ERLANGER et coll. (146) pour la préparation du dérivé correspondant de l'ornithine.

On dissout 11 g (50 mM) de dichlorhydrate de L-lysine (provenance Hoffmann LaRoche, $[\alpha]_D^{20}$ + 16,5 c=2, eau) dans 200 cc d'eau ; on ajoute 7,5 g de carbonate basique de cuivre ($CuCO_3Cu(OH)_2$) et on chauffe à ébullition pendant 20 minutes. Après filtration et refroidissement, on ajoute, sous agitation vigoureuse, une solution de 13,3 g (70 mM) de chlorure de p-toluènesulfonyle dissous dans 100 cc d'acétone et 35 cc de NaOH 2N. On continue l'agitation pendant la nuit. On essore et on lave le précipité formé à l'eau, à l'alcool et à l'éther. Le complexe cuivrique (chélate) de la N$^{\varepsilon}$-tos-L-lysine, obtenu sous forme de poudre bleu-violet, est dissous dans 100 cc d'HCl 2N. On passe à travers cette solution un courant d'H_2S pendant 3 heures, on chasse l'H_2S dissous et on filtre sur une couche d'hyflosupercel. Lorsqu'on ramène le pH à 5-6 par addition de pyridine, la N$^{\varepsilon}$-tos-L-lysine précipite, On obtient ainsi 10,8 g (rendement 72 %), Fc 234-236º déc. Litt. (197) : 237-238º déc. et (254) : 234-237º déc. R_FI 0,67, R_FIII 0,77, R_FIV 0,59.
$[\alpha]_D^{21}$ + 12,9º±1º (c=2,25 ; HCl 2N) Litt. (197) ; +13,6º (c=3,2 ; HCl 2N)

N$^{\alpha}$-carbobenzoxy-N$^{\varepsilon}$-tosyl-L-lysine

On dissout 7,5 g (25 mM) de N$^{\varepsilon}$-tos-L-lysine dans 25 cc d'NaOH N, on ajoute 5,3 g (32 mM) de chlorure de carbobenzoxy* et 32 cc de NaOH N, en quatre portions

* voir ci-après : Préparation des réactifs.

et on agite vigoureusement pendant 2 heures. Après addition d'eau et extraction de l'excès de chlorure de carbobenzoxy, la solution est acidifiée par HCl 5N jusqu'à réaction Congo. On extrait le produit par l'acétate d'éthyle et on lave cette solution à l'eau, on sèche sur Na_2SO_4 et on évapore au vide : on obtient une huile visqueuse que l'on reprend plusieurs fois avec du toluène sec, en évaporant sous vide chaque fois. Par trituration avec de l'hexane, l'huile s'épaissit à la glacière en une masse semi-solide. On obtient ainsi 10 g de N^{α}-cbz-N^{ε}-tos-L-lysine. Par chromatographie on révèle une tache à la β-méthylombelliférone ou au chlore : R_FII 0,73 et R_FI 0,90. On recristallise dans l'acétate d'éthyle/hexane, Fc 86-88º Litt. (197) : 85-88º $[\alpha]_D^{21}$ - 13,3º±2º (c=0,93 ; $NaHCO_3$ 5%) Litt. (197) ; -13,3º (c=1 ; $NaHCO_3$ 5%)

N^{α}-tosyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysine

On obtient ce dérivé par tosylation de la N^{ε}-cbz-L-lysine avec un rendement de 74,5 % . Fc 117,5-119º. Recristallisation dans le benzène, Fc 121-123º Litt. (245b) : 123-124º et (246a) : 126º $[\alpha]_D^{20}$ + 23,5º±2º (c=1,15 ; chloroforme)

R_FII 0,77 (révélation par la β-méthylombelliférone)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{21}H_{26}O_6N_2S$ = 434,5 Calc. % : N 6,44

Tr. : 6,46

N^{α}-tosyl-L-lysine

1,3 g de N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine (2 fois recristallisé dans le benzène) dissous dans du méthanol à 80% sont soumis à l'hydrogénolyse en présence de noir de palladium. Après 3 heures 1/2, l'évolution du CO_2 est terminée et la N^{α}-tos-L-lysine précipitée. On dissout le précipité dans l'eau chaude, et, après évaporation à sec, on obtient 0,81 g de N^{α}-tos-L-lysine (rendement 90 %). Par chromatographie sur papier, on révèle une seule tache positive à la ninhydrine, R_FIII 0,64, R_FIV 0,62.

On recristallise dans l'eau, F inst. 260º déc. Litt. (245a) : 263-264º

$[\alpha]_D^{20}$ - 8,3º±1º (c=1,8 ; HCl 2N)

Dichlorhydrate du L-lysine methyl-ester

L'estérification de la L-lysine a été effectuée par $SOCl_2/CH_3OH$ selon la méthode que BRENNER et HUBER (202) ont utilisée pour la préparation des esters méthyliques de la L-leucine et de la L-méthionine. Pour déterminer les meilleures conditions, on a fait une série d'essais en variant la proportion de $SOCl_2$ et de CH_3OH, la température et la durée de la réaction.

A 3,3 cc de méthanol absolu refroidi à -15º par un mélange glace/sel, on ajoute sous agitation goutte à goutte 0,85 cc (11,9 mM) de chlorure de thionyle fraichement distillé (provenance Eastman Kodak). Dans ce mélange on verse en portions 2,33 g (10,8 mM) de dichlorhydrate de L-lysine en poudre (provenance Hoffmann LaRoche; $[\alpha]_D^{20}$ + 16,5 c=2, eau). On continue l'agitation et on laisse monter la température ; on chauffe le mélange à 40º pendant 2 heures et on laisse encore 24 heures à la température du laboratoire. On évapore sous vide à la température ordinaire, on redissout le résidu dans du méthanol anhydre et on évapore de nouveau. En ajoutant lentement de l'éther sec sous refroidissement, on obtient un produit qui cristallise sous forme d'aiguilles fines. On obtient ainsi 2,38 g (rendement 79,7 %) Fc 188-204º (décomposition avec effervescence). L'examen de ce produit par chromatographie sur papier révèle la présence, à côté du lysine-methyl-ester (R_FIII 0,31) de traces d'un produit secondaire (R_FIII 0,50) correspondant probablement à l'amino-3-homopiperidone (255). Par recristallisation dans le méthanol/éther, on obtient le dichlorhydrate de L-lysine methyl-ester chromatographiquement pur. Le produit, même après une deuxième recristallisation est légèrement hygroscopique, Fc 204-205º déc. Litt. (15a) : 212º, (256) : 203-204º déc. $[\alpha]_D^{20}$ + 17,8º (c=1,29, eau) Litt. (256) : + 15º,9±0,8 (c=1,29,eau)

Chlorhydrate de N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysine methyl-ester

Ce dérivé est obtenu par estérification au $SOCl_2/CH_3OH$ de la N^{ε}-cbz-L-lysine préparée par carbobenzoxylation du complexe cuivrique de la L-lysine (décrit précédemment

pour la préparation de la N^{ε}-tosyl-L-lysine).

14 g (50 mM) de N^{ε}-cbz-L-lysine sont ajoutés dans le mélange refroidi à -15º de 16 cc de méthanol absolu et de 4 cc de chlorure de thionyle. On ajoute encore quelques cc de méthanol pour obtenir un mélange fluide, facile à agiter. Après 48 heures à +4ºC, 90 % environ de N^{ε}-cbz-lysine est estérifiée. On laisse encore 24 heures à la température ordinaire. On évapore sous vide, on redissout dans du méthanol et on chasse à nouveau le solvant. Le résidu obtenu, dilué avec une petite quantité d'éther est versé dans un grand volume d'éther anhydre refroidi : il se forme immédiatement un précipité cristallin. On obtient ainsi 15,3 g (rendement 92,7 %) de chlorhydrate de N^{ε}-cbz-lysine methyl-ester. Par chromatographie sur papier, on révèle le N^{ε}-cbz-lysine methyl-ester (R_FIII 0,89) et des traces de lysine methyl-ester (R_FIII 0,31) qui provient de la scission du groupement N^{ε}-carbobenzoxy par l'HCl. La tache correspondant à la N^{ε}-cbz-lysine (R_FIII 0,76) a disparu.

La quantité de lysine methyl-ester ainsi formée est beaucoup moins importante que lors de l'estérification de la N^{ε}-cbz-lysine par HCl/CH_3OH suivant la méthode de Fischer.

On recristallise dans le méthanol/éther, Fc 116-117º Litt. (15b) : 117º $[\alpha]_D^{20}$ +13,3º±2º (c=1,81 ; eau) et + 14,4º±2º (c=1,67 ; méthanol)

Chlorhydrate de N^{ε}-tosyl-L-lysine methyl-ester

L'estérification de la N^{ε}-tos-lysine a été effectuée par la méthode de Fischer au HCl/CH_3OH, le groupement tosyle étant plus résistant à l'acidolyse que le groupement carbobenzoxy dans ces conditions.

On dissout 8,2 g de N^{ε}-tos-L-lysine dans 200 ml de méthanol anhydre et on fait passer du gaz HCl sec, à froid, jusqu'à saturation. On laisse une heure et ensuite on distille sous vide. On recommence la même opération 2 fois. Le résidu obtenu cristallise dans éthanol/éther. On obtient ainsi 8,5 g de chlorhydrate de N^{ε}-tos-lysine-

méthyl-ester (rendement 86 %). Par chromatographie sur papier on révèle une seule tache (R_FIII 0,87) et pas de traces de lysine methyl-ester comme dans le cas de la N^{ε}-cbz-lysine methyl-ester. On recristallise dans éthanol/éther, Fc 133,5-134º Litt. (257) : 135º $[\alpha]_D^{20}$ + 16,0º±1,5º (c=2,05 ; méthanol)

Analyse : (produit séché à 60º)

$C_{14}H_{23}O_4N_2SCl$: 356,86 Calc. % : C 47,95 H 6,60 N 7,98

Tr. : 48,21 6,95 8,60

Chlorhydrate de N^{α}-tosyl-L-lysine methyl-ester

L'estérification de la N^{α}-tos-L-lysine a été effectuée d'une part, par la méthode de BRENNER et HUBER (202) au $SOCl_2/CH_3OH$ et, d'autre part, par la méthode de Fischer au HCl/CH_3OH. Le résultat était le même du point de vue rendement et pureté du produit obtenu, le groupement tosyle étant plus résistant à l'acidolyse par HCl que le groupement carbobenzoxy.

On traite la N^{α}-tosyl-L-lysine avec une solution de HCl/CH_3OH et on évapore à sec sous vide ; on répère 3 fois cette opération. L'examen du produit obtenu, par chromatographie sur papier, montre que la totalité de la N^{α}-tos-L-lysine est estérifiée. On recristallise dans l'éthanol/éther. Rendement 77 %. Fc 143-145º Litt. (245a) : 146-147º $[\alpha]_D^{20}$ - 11,5º±1º (c=1,66 ; eau)

R_FIII 0,86, R_FIV 0,84

Chlorhydrate de N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysine amide

La préparation de ce dérivé a été effectuée par l'action de NH_3/CH_3OH sur l'ester méthylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine libéré, préalablement de son chlorhydrate selon WALEY et WATSON (90).

A 4,33 g de chlorhydrate de N^{ε}-cbz-L-lysine methyl-ester mis en suspension dans 25 cc d'eau, on ajoute 50 ml d'acétate d'éthyle et sous refroidissement 20 cc d'une solution de $KHCO_3$ 2M. Après 4 extractions par l'acétate d'éthyle, on obtient toute

la quantité de N^{ε}-cbz-L-lysine methyl-ester, tandis que l'ester méthylique de la L-lysine et des traces de lysine, qui accompagnent la préparation brute de ce chlorhydrate, restent dans la solution de bicarbonate. On sèche sur Na_2SO_4 la solution d'acétate d'éthyle et on évapore sous vide à la température ordinaire : l'huile obtenue est dissoute dans 60 cc de méthanol anhydre saturé préalablement à 0º avec du NH_3 sec. On garde la solution pendant 4 jours à la température ordinaire, dans un flacon à pression, hermétiquement bouché.

L'examen par chromatographie sur papier montre la disparition complète de l'ester (R_FIII 0,89) qui est remplacé par l'amide (R_FIII 0,83).

Après évaporation du solvant, addition du méthanol et nouvelle évaporation sous vide on obtient un sirop jaunâtre qu'on dissout dans 50 cc d'éther saturé d'HCl sec. Le produit se sépare sous forme d'un précipité floconneux. On obtient ainsi 3,3 g de chlorhydrate de N^{ε}-cbz-L-lysine amide (rendement 79,8 %) Fc 192-196º. On recristallise dans le méthanol absolu/acétone, Fc 201-202º, Litt. (15b) : 203º
$[\alpha]_D^{20}$ + 18,1º±2º (c=1,61 ; diméthylformamide), R_FIII 0,83.

N^{α}-tosyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysine methyl-ester

On obtient ce dérivé par tosylation de l'ester méthylique de la N^{ε}-cbz-L-lysine libéré de son chlorhydrate suivant le procédé décrit précédemment pour la préparation de l'amide de la N^{ε}-cbz-L-lysine.

Pour effectuer la tosylation, on a utilisé deux méthodes différentes : suivant la première, à une solution d'ester méthylique de N^{ε}-cbz-L-lysine obtenue à partir de 2,6 g de son chlorhydrate, on ajoute, par portions, alternativement, 2,5 g de chlorure de p-toluènesulfonyle et 1,5 cc de pyridine, sous agitation et refroidissement pendant 30 minutes. On continue l'agitation encore 1 heure 1/2 et on laisse pendant la nuit à la température ordinaire. Après dilution avec de l'eau, on extrait le produit à l'éther et on lave les extraits éthérés réunis avec une solution de HCl

à 2 %, ensuite plusieurs fois avec une solution froide de $NaHCO_3$ à 3 % et enfin avec de l'eau jusqu'à neutralité. On sèche sur Na_2SO_4 et on évapore à sec ; on triture le résidu avec de l'éther de pétrole plusieurs fois. On obtient ainsi 2,6 g de N^{α}-tosyl-N^{ε}-cbz-L-lysine methyl-ester (rendement 75 %). Fc 74-77º. On recristallise dans l'éther/éther de pétrole, Fc 78-79º Litt. (254a) : 80-81º.

Suivant le deuxième procédé, à une solution d'ester méthylique de N^{ε}-cbz-L-lysine dans l'acétate d'éthyle (obtenue à partir de 9,8 g de son chlorhydrate), on ajoute 40 cc d'eau, 5,8 g de chlorure de p-toluènesulfonyle dissous dans 25 cc d'acétate d'éthyle, et 1,6 g de Na_2CO_3 en poudre. Le mélange est agité virougeusement sous refroidissement, pendant 3 heures, et laissé pendant la nuit à la chambre froide. On sépare la couche d'acétate d'éthyle que l'on lave 2 fois avec une solution d'HCl à 2 % et ensuite avec de l'eau, jusqu'à neutralité. On sèche sur Na_2SO_4, on évapore à sec et on triture le résidu avec de l'éther de pétrole. On obtient ainsi 13,5 g du produit brut (rendement 75 %), Fc 63-70º. On cristallise dans éther/éther de pétrole, Fc 76-77,5º et on recristallise une deuxième fois dans le même solvant, Fc 79-80º $[\alpha]_D^{20}$ + 20,0º±1,5º (c=1,95 ; Chloroforme) et 0,1º±1º (c=1,8 ; méthanol)

N^{α}-tosyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysine hydrazide

A une solution de 2,8 g de N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine methyl-ester dans 6 cc d'éthanol absolu, on ajoute 1 cc d'hydrate d'hydrazine et on chauffe le mélange pendant 1 heure 1/2 à reflux. On laisse une nuit à température ordinaire et ensuite pendant quelques heures à la glacière : l'hydrazide cristallise. Le produit brut (Fc106-140º) est recristallisé dans l'éthanol absolu. On obtient ainsi 2,5 g de N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine hydrazide (rendement 90 %), Fc 139-140º.

La même préparation a été effectuée à partir de 8,1 g de N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine - methyl-ester chauffés à reflux avec 3,5 cc d'hydrate d'hydrazine dans 18 cc d'éthanol absolu. Après recristallisation dans l'éthanol absolu, on obtient 6,9 g d'hydrazide

(rendement 86 %) Fc 139,5-141,5º et après une nouvelle recristallisation dans le même solvant Fc 142,5-143,5º $[\alpha]_D^{20}$ - 9,9º±1º (c=3,51 ; ac. acétique glacial) R_F I 0,92, R_F II 0,83 (révélation au réactif Folin/NH_3).

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{21}H_{28}O_5N_4S$ = 448,5 Calc. % : C 56,23 H 6,29 N 12,49

Tr. : 56,26 6,32 12,38

N^{α}-tosyl-N^{ε}-carbobenzoxy-L-lysine amide (par décomposition de l'azide correspondant)

On obtient l'amide de la N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine comme produit secondaire pendant la préparation de l'azide de la N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine à partir de son hydrazide. On dissout 2,5 g (5,5 mM) de N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine hydrazide dans 9 cc d'acide acétique glacial, 35 cc d'eau et 2,3 cc d'acide chlorhydrique concentré. A cette solution claire, recouverte de 50 cc d'éther, sous refroidissement avec un mélange glace/sel, on ajoute sous agitation, goutte à goutte, une solution refroidie de 0,57 g de $NaNO_2$ dans 1 cc d'eau. Après 3 à 5 minutes, on lave la phase éthérée avec de l'eau glacée, puis avec une solution froide de $NaHCO_3$ à 5 %, et enfin avec de l'eau glacée jusqu'au virage de la réaction Congo. Pendant cette opération, on constate la formation d'un produit cristallisé qui s'accumule à l'interface éther/eau et dont la quantité augmente avec le temps, même si l'on conserve la solution à 0º. Par filtration de la solution éthérée ainsi que des eaux de lavage, on recueille 0,5 g d'amide (rendement 21 %). Fc 142-151º.

Dans une deuxième préparation d'azide, à partir de 2,5 g d'hydrazide dissous dans 9,5 cc d'acide acétique glacial, 45 cc d'eau, 6 cc d'acide chlorhydrique 5N, et traité avec une solution de 0,55 g de $NaNO_2$ dans 1 cc d'eau, on obtient 0,8 g d'amide (rendement 33 %).

Dans une troisième préparation enfin, à partir de 3,2 g (7,1 mM) d'hydrazide dissous dans 10 cc d'acide acétique, 50 cc d'eau, 3 cc d'acide chlorhydrique concen-

tré et traité avec 0,6 g de $NaNO_2$, on obtient 0,79 g d'amide (rendement 22 %) Fc 149-153º.

Le produit brut est recristalissé une première fois dans l'éthanol à 95º Fc 154-157º, et une deuxième fois dans l'éthanol absolu, Fc 159-160,5º Litt. (245a) : Fc 157-158º. $[\alpha]_D^{20}$ + 19,9º±1º (c=2,47 ; diméthylformamide)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{21}H_{27}O_5N_3S$ = 433,5 Calc. % : C 58,18 H 6,27 N 9,69

Tr. : 58,15 6,18 9,47

N^{α}-tosyl-L-lysine amide, chlorhydrate

On a obtenu ce dérivé par hydrogénation catalytique, au noir de palladium, de l'amide de la N^{α}-tos-N^{ε}-cbz-L-lysine, dissoute dans le méthanol, en présence d'un équivalent d'HCl. Rendement 88 %. R_FI 0,58, R_FIII 0,66. On recristallise dans le méthanol/éther ou méthanol/acétone. Le produit cristallisé est hygroscopique. Fc 105-106º déc. $[\alpha]_D^{20}$ + 30,8º±0,5 (c=2,3 ; diméthylformamide)

Une partie aliquote de cette amide a été soumise à l'hydrolyse enzymatique par la trypsine, dans un mélange tampon de phosphates à pH 7,7 (concentration en substrat : 0,025 M ; concentration en enzyme : 0,8 mg/cc de trypsine et 0,01 M de $CaCl_2$).

Des prises d'essai examinées par chromatographie sur papier ont montré que l'amide de la N^{α}-tos-L-lysine était hydrolysée avec, à peu près, la même vitesse que l'amide de la N^{α}-benzoyl-L-arginine (substrat-test de la trypsine) soumise, dans les mêmes conditions, à l'hydrolyse trypsique.

Le produit de l'hydrolyse enzymatique, la N^{α}-tosyl-L-lysine, était identifié par comparaison avec le produit obtenu par synthèse et décrit précédemment.

p-Toluènesulfonate de L-valine benzyl-ester

Nous avons essayé trois méthodes différentes pour la préparation de cet ester : par la méthode de MILLER et WAELSCH (93) (chauffage de quantités équivalentes de valine et d'acide benzènesulfonique avec un excès d'alcool benzylique (5 équivalents), élimination de l'alcool benzylique par distillation sous vide et répétition de la même opération), on a obtenu une polymérisation partielle et la formation de produits colorés et fluorescents, peu solubles dans les solvants des esters.

Par la méthode d'ERLANGER et HALL (94), l'estérification de la valine en présence d'acide polyphosphorique (provenance : Victor Chemical Works, Chicago 4, Illinois) était partielle (inférieure à 50 %), même après chauffage prolongé.

Nous avons obtenu l'estérification de la valine par l'alcool benzylique en présence d'acide p-toluènesulfonique en éliminant l'eau formée par distillation azéotropique, suivant la méthode de CIPERA et NICHOLLS (95).

11,7 g (0,1 M) de L-valine et 20,9 g (0,11 M) d'acide p-toluènesulfonique monohydrate, sont dissous, en chauffant, dans 40 cc d'alcool benzylique (fraichement distillé). On ajoute 100 cc de tétrachlorure de carbone et on distille le mélange lentement, en ajoutant, à intervalles réguliers, une nouvelle quantité de CCl_4 sec pour garder constante la composition du mélange. On contrôle le degré d'estérification en examinant des prises d'essai par chromatographie sur papier. L'estérification était complète après 18 heures. On ajoute, à la solution tiède, du CCl_4 jusqu'à l'apparition d'un trouble, et on laisse à la glacière. Le p-toluènesulfonate de L-valine benzyl-ester précipite sous forme d'une masse de cristaux soyeux. On essore le précipité, on lave à l'éther sec et on sèche. On obtient ainsi 27 g (rendement 72 %), Fc 151-153º. On recristallise dans l'acétate d'éthyle/éther, Fc 156-157,5º Litt. (258) 158-160º $\left[\alpha\right]_D^{20}$ - 7,1º±2º (c=1,12 ; HCl 0,1N) et - 3,9º±1º (c=1,95 ; éthanol absolu)

R_F III 0,90

Analyse : (produit séché à 60º)

$C_{19}H_{25}O_5N$ S = 379,4 Calc. % : C 60,14 H 6,64 N 3,69

Tr. : 61,18 6,83 3,81

Nous avons préparé plus facilement cet ester, en éliminant l'eau par distillation azéotropique avec du toluène et en utilisant le dispositif de Stark et Dean (rendement 75 %).

Chlorhydrate de L-valine benzyl-ester

4,3 g (0,015 M) de p-toluènesulfonate de L-valine benzyl-ester sont dissous dans 10 cc de chloroforme sec. A cette solution refroidie, on ajoute, lentement et sous agitation, 5,2 cc d'une solution de NH_3 dans du chloroforme sec (de concentration 2,4 % environ). On continue l'agitation encore 20 minutes : le p-toluènesulfonate d'ammonium forme un abondant précipité. On contrôle, sur le filtrat d'une partie aliquote, si l'addition de solution de NH_3 ne produit pas une nouvelle précipitation de sulfonate d'ammonium. Le filtrat est concentré sous vide (sous exclusion d'humidité) redissous dans du tétrahydrofuranne sec et concentré de nouveau à sec. On obtient 1,73 g d'ester benzylique de L-valine sous forme d'un sirop (rendement 53 %). On le dissout dans un petit volume d'éther anhydre et on ajoute de l'éther sec saturé de gaz HCl sec. Le chlorhydrate de l'ester benzylique de la valine précipite sous forme d'une masse de cristaux soyeux, Fc 133,5-136,6º. On recristallise dans le méthanol/éther, 135,5-137º $[\alpha]_D^{20}$ - 10,3º±2º (c=1,12 ; eau) et -11,7º±2º (c=1,02 ; HCl 0,1 N)

Analyse : (produit séché à 60º)

$C_{12}H_{18}O_2NCl$ = 243,7 Calc. % : C 59,17 H 7,38 N 5,75

Tr. % : 60,10 7,67 5,70

Nous avons constaté à plusieurs reprises que la libération des esters benzyliques de la valine et de certains autres acides aminés à partir de leurs sels avec l'acide p-toluènesulfonique, suivant la méthode de HILLMANN au $NH_3/CHCl_3$ (249), s'effectue

avec un rendement moyen. Il en est de même avec la méthode de MILLER et WAELSCH (93) à la triéthylamine dans le chloroforme. On obtient un meilleur rendement (80-85 %) en effectuant la libération avec une solution aqueuse refroidie de K_2CO_3 et en extrayant rapidement l'ester avec de l'acétate d'éthyle : la solution d'acétate d'éthyle, séchée sur Na_2SO_4, est utilisée soit immédiatement pour effectuer le couplage, soit par la préparation du chlorhydrate.

Chlorhydrate de L-valine methyl-ester

La préparation de ce dérivé a été effectuée, d'une part suivant SMITH et coll. (223), en chauffant à reflux une suspension de L-valine dans du méthanol anhydre, saturé de gaz HCl sec, (rendement 60 %), et d'autre part, suivant la méthode de BRENNER et HUBER (202), au $SOCl_2/CH_3OH$, en chauffant le mélange à reflux. R_FIII 0,74. On recristallise dans méthanol/éther (rendement 81 %). Fc 166-168º Litt. (223) ; 167,5º-168º, $[\alpha]_D^{20}$ + 14,8º±1º (c=2,31 ; eau), Litt. (223) ; + 15,5º(c=2 ; eau).

Chlorhydrate de diester benzylique de l'acide aspartique.

Pour obtenir ce dérivé (utilisé pour la préparation du dipeptide acide valyl-aspartique), nous avons essayé la méthode employée par SACHS et BRAND (259), pour la préparation du chlorhydrate de diester benzylique de l'acide L et D-glutamique.

On met en suspension 13,3 g (0,01 M) d'acide L-aspartique dans 175 cc d'alcool benzylique, on chauffe le mélange à 50º et on fait passer, sous agitation, un courant de gaz HCl sec, pendant une heure. On ajoute 80 cc de benzène et on distille l'eau formée. On fait passer encore deux fois du gaz HCl sec et on concentre comme précédemment. On distille une grande partie de l'alcool benzylique sous vide en chauffant le mélange au bain-marie et, après refroidissement, on précipite le produit en ajoutant un grand volume d'éther sec. Le chlorhydrate de diester benzylique de l'acide aspartique cristallise sous forme de longues aiguilles en rosace. On obtient 26,2 g (rendement 75 %) d'un produit brut : l'examen par chromatographie sur papier montre,

après révélation à la ninhydrine la présence de traces d'acide aspartique (R_FIII 0,12, coloration bleu-gris), et une quantité plus importante de monobenzyl-ester (R_FIII 0,62, coloration violette). On élimine ces produits secondaires en libérant le diester de son chlorhydrate par $NH_3/CHCl_3$, selon HILLMANN (249) : l'acide aspartique et son mono-ester benzylique précipitent en même temps que le chlorure d'ammonium formé et sont éliminés par filtration. En faisant passer un courant de gaz HCl sec à travers la solution de diester libre dans de l'éther sec, on obtient le chlorhydrate, qui cristallise sous forme d'aiguilles. R_FIII 0,92, R_FI 0,84 (coloration jaune-citron, virant ensuite au brun) Fc 102-104º ; après deux recristallisations dans méthanol/éther : Fc 108-109º Litt. (260) : 124-125º et (33): 123-124º pour la forme L ; (198) : 108-109º pour la forme DL.

$[\alpha]_D^{20}$ 0,6º±1º (c=4,75 ; eau).

Après hydrogénation catalytique d'une partie aliquote de ce dérivé, dissoute dans l'acide acétique à 60 %, on a isolé de l'acide aspartique chromatographiquement pur, dont le pouvoir rotatoire était : $[\alpha]_D^{20}$ 0,4º±1º (c=2,30 ; HCl 6N) Litt. (242a) : +24,5º (c=2 ; HCl 6N) pour l'acide L-aspartique : ces données montrent que, pendant la préparation du diester benzylique à partir de l'acide L-aspartique, le chauffage du mélange réactionnel durant la distillation sous vide de l'alcool benzylique a provoqué la racémisation de cet ester.

β-Benzyl-ester de l'acide N-carbobenzoxy-L-aspartique

Ce dérivé a été préparé suivant deux voies différentes :

a) par hydrolyse partielle du diester benzylique de l'acide N-carbobenzoxy-L-aspartique

La préparation du β-benzyl-ester de l'acide N-carbobenzoxy-L-aspartique suivant cette voie a été effectuée en trois étapes selon BERGER et KATCHALSKI (242).

1) on obtient l'acide N-carbobenzoxy-L-aspartique suivant la méthode de BERGMANN

et ZERVAS (13) avec un rendement de 81 %, Fc 116-117º Litt. (13) : 116º et (261) : 116-117º, R_FII 0,23-0,26 (révélation à la β-méthylombelliférone)

2) on transforme l'acide N-carbobenzoxy-L-aspartique en diester benzylique par traitement à chaud avec de l'alcool benzylique, du toluène, de l'acide p-toluènesulfonique, et élimination de l'eau formée par distillation azéotropique avec un dispositif de Stark et Dean. Le diester benzylique est obtenu à l'état cristallisé avec un rendement de 70 %. On recristallise dans l'éther de pétrole ou dans l'éther butylique. On obtient ainsi le diester benzylique de l'acide N-cbz-L-aspartique sous forme de fines aiguilles soyeuses. Fc 67-68º Litt. (242) : 66,5º et 67º et (261) : 63,5-64,5º. $[\alpha]_D^{21}$ + 4,2º±0,5º (c=5,07 ; benzène) Litt. (242a) : + 3,5º (c=10 : benzène) et (261) : + 4,14º (c=10, benzène).

3) la saponification partielle de ce diester est effectuée par l'action, à la température ordinaire pendant 24 heures, d'un équivalent de NaOH sur le diester dissous dans un mélange de dioxanne et d'eau. Le monoester obtenu par hydrolyse préférentielle du groupement α-benzyle est dissous dans une solution N de $KHCO_3$. Le diester non saponifié est éliminé par lavages de cette solution à l'éther, et la solution aqueuse est acidifiée avec HCl 5N jusqu'à réaction Congo positive. L'ester β-benzylique de l'acide N-cbz-L-aspartique est obtenu à l'état cristallisé, avec un rendement de 70 %, Fc 103-105º. On recristallise dans le benzène, Fc 108-109º Litt. (242) : 108º et (244) : 107-109º.

b) <u>par carbobenzoxylation du α-benzyl-ester de l'acide L-aspartique</u>

1) Nous avons préparé le <u>β-benzyl-ester de l'acide L-aspartique</u> suivant la méthode qui nous a été aimablement communiquée par E. KATCHALSKI (243).

13,3 g d'acide L-aspartique (0,1 M), 17 cc d'acide chlorhydrique concentré et 130 cc d'alcool benzylique (fraichement distillé) ont été chauffés sous agitation à 70º pendant 1 heure. On distille sous vide l'eau formée (trompe à eau, température du bain 70º), on ajoute ensuite 8 cc d'acide chlorhydrique concentré et on répète la

distillation comme précédemment. A la solution refroidie, on ajoute 100 ml d'une solution de $KHCO_3$ à 20 % : le β-benzyl-ester de l'acide L-aspartique précipite immédiatement sous forme de cristaux. On ajoute 200 cc d'éther, on triture bien le précipité, et, après une heure à la glacière, on l'essore et on le lave plusieurs fois à l'éther. On obtient ainsi 10,75 g (rendement 45,3 %). Après lavage à l'eau glacée jusqu'à neutralité et séchage, il reste 9,75 g. Dans une deuxième préparation, on obtient un rendement de 45 % après lavage à l'éther et à l'eau.

L'examen du produit obtenu, par chromatographie sur papier, montre la présence de traces d'acide aspartique (coloration gris-violette) et une tache de couleur jaune abricot (R_FIII 0,64, R_FI 0,69), correspondant à l'ester β-benzylique* ; l'examen des eaux-mères (solution de bicarbonate) montre la présence d'acide aspartique et d'une importante quantité d'ester α-benzylique (R_FIII 0,62, R_FI 0,72, coloration violette*). L'examen des eaux de lavage montre la présence de traces d'acide aspartique et deux autres taches qui se chevauchent, l'une de couleur violette et l'autre jaune-abricot. On recristallise 1 g du produit obtenu, dissous dans 50 cc d'eau chaude après neutralisation par quelques gouttes de KOH N (pH 6-6,5). On obtient ainsi 0,75 g d'ester

---

* Par acidolyse du groupement N-carbobenzoxy par HBr/CH_3COOH des parties aliquotes des dérivés β-benzyl-ester de l'acide N-cbz-L-aspartique (dont la préparation est décrite précédemment) et α-benzyl-ester de l'acide N-cbz-L-aspartique (aimablement fourni par le Professeur L. ZERVAS), nous avons obtenu respectivement les bromhydrates de β-benzyl-ester et d'α-benzyl-ester de l'acide L-aspartique, à l'état cristallisé.

L'examen par chromatographie sur papier de ces deux esters a montré que l'α-ester donne, avec la ninhydrine, une tache violette, tandis que le β-ester se colore en jaune-abricot.

β-benzylique de l'acide L-aspartique, sous forme de feuilles prismatiques allongées. Fc 219-221º déc.. Litt. (243) : 227º déc. $[\alpha]_D^{20}$ + 22,8º±2º (c=1,15 ; 0,1 N HCl) Litt. (243) : + 25º (c=1,0 ; 0,1 N HCl) et (97) : + 23º (c=1,0 ; N HCl)

Analyse : (produit séché à 80º)

$C_{11}H_{13}O_4N$ = 223,2 Calc. % : C 59,18 H 5,87 N 6,27

Tr. : 59,0 5,63 6,12

2) La carbobenzoxylation du dérivé précédent a été effectuée en traitant, à la température ordinaire, un équivalent d'ester dissous dans une solution de $NaHCO_3$ à 20 % avec 1,2 équivalents de chlorure de carbobenzoxy, sous agitation vigoureuse. On contrôle le pH du mélange réactionnel et on maintient la réaction à pH 8 environ, en ajoutant du $NaHCO_3$. On continue l'agitation pendant 3 heures à la température ordinaire. On élimine l'excès de chlorure de carbobenzoxy et les produits de sa décomposition, en lavant la solution alcaline à l'éther, et on acidifie avec HCl 5N jusqu'à réaction Congo positive. Le précipité est extrait par l'acétate d'éthyle. Cette solution est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 et ensuite évaporée sous vide. Le résidu se solidifie à la glacière. On recristallise dans le benzène, Fc 107-108º ; après deux recristallisations dans ce solvant, Fc 108º Litt. (242) : 108º et (244) : 107-109º $[\alpha]_D^{20}$ + 12,2º±1º (c=5,37 ; ac. acétique glacial) Litt. (242a) : + 12,1 (c=10, ac. acétique glacial) et (244) : + 13,1 (c=10 ; ac. acétique glacial) R_F II 0,70-0,72 (révélation à la β-méthylombelliférone).

Chlorhydrate du β-méthyl-ester de l'acide L-aspartique

La méthode d'estérification partielle de l'acide aspartique selon COLEMAN (262) par l'action à la température ordinaire du méthanol anhydre contenant un équivalent de gaz HCl sec, suivie par la précipitation fractionnée du chlorhydrate de β-monoester, nous a donné des résultats peu satisfaisants : l'estérification étant très rapide dans ces conditions, l'arrêt de la réaction au stade d'estérification voulu

est difficile à réaliser d'une manière reproductible. Par chromatographie sur papier du produit ainsi obtenu, on révèle à la ninhydrine la présence, en dehors de l'acide aspartique non estérifié, trois autres taches distinctes.

En effectuant l'estérification à -10º, suivant la méthode de BRENNER et HUBER (202) au $SOCl_2/CH_3OH$, nous avons pu suivre par chromatographie sur papier, la marche de la réaction et obtenir l'ester β-methylique en opérant d'une manière analogue à celle utilisée par BOISSONNAS et coll. (30) pour la préparation de l'ester γ-méthylique de l'acide glutamique.

A 50 cc de méthanol sec refroidi par un mélange glace/sel, on ajoute goutte à goutte 7,4 cc (103 mM) de $SOCl_2$ (fraichement distillé) et ensuite 10 g (79 mM) d'acide L-aspartique en portions, en laissant la température monter. Des prises d'essais, examinées par chromatographie sur papier, montrent que dans les 20 à 25 premières minutes la moitié de l'acide aspartique est transformée en mono-methyl-ester sans formation de dimethyl-ester. L'arrêt de la réaction à cette étape permet d'obtenir un mélange d'acide aspartique et de mono-ester. L'élimination de l'acide aspartique par recristallisation fractionnée est laborieuse et conduit à des rendements médiocres. Nous avons utilisé dans ce but le passage du mélange sur une colonne, soit d'alumine, soit d'Amberlite IR-4.

D'autre part, en laissant le mélange réactionnel à la température ordinaire pendant 4 heures 1/2, on obtient la transformation de toute la quantité d'acide aspartique en β-methyl-ester (R_FIII 0,26, coloration abricot) et en partie en dimethyl-ester (R_FIII 0,64, coloration jaune-citron). Par addition de 150 cc d'éther, on précipite alors le chlorhydrate de β-methyl-ester, tandis que, dans le filtrat, il reste, dans ces conditions, toute la quantité de dimethyl-ester formé et une petite partie du mono-ester. Rendement43 % Fc 183-186º. En recristallisant dans le méthanol/éther : Fc 188-190º Litt. (42) : 191-193º. R_FIII 0,26 (coloration abricot).

β-Methyl-ester de l'acide N-carbobenzoxy-L-aspartique

La carbobenzoxylation du β-methyl-ester de l'acide aspartique (5,94 g) a été effectuée par la méthode décrite précédemment pour la préparation du β-benzyl-ester de l'acide N-cbz-L-aspartique. On obtient ainsi 6 g (rendement 65,9 %), Fc 95-97º Litt. (42) : 98º. R_F II 0,60 à 0,64 (révélation à la β-methylombelliférone).

D. PREPARATION DES REACTIFS

Chlorure de carbobenzoxy

La préparation de ce réactif par addition d'alcool benzylique (fraichement distillé) dans une solution toluénique de phosgène (oxychlorure de carbone à 20 % dans le toluène, "Prolabo"), suivant la méthode de BERGMANN et ZERVAS (13), nous a donné à plusieurs reprises un liquide jaune qui devient rapidement brun, et noirâtre après quelques semaines de conservation à la chambre froide.

La préparation effectuée suivant la méthode de CARTER et coll. (209) avec une solution de phosgène dans du toluène, préalablement purifié et redistillé, nous a donné un produit beaucoup moins coloré, mais qui devient brun après quelques mois à la chambre froide.

La chlorure de carbobenzoxy, après élimination d'une partie du toluène par distillation sous vide à 50º, ne peut pas se soumettre à une distillation fractionnée, ce chlorure se décomposant facilement et quelquefois avec violence (L. ZERVAS, communication privée).

La préparation du chlorure de carbobenzoxy, selon la méthode de FARTHING (263) (par passage du phosgène (gaz) à travers l'alcool benzylique refroidi par un mélange d'éthanol et de carboglace) a, par contre, donné un produit incolore qui se conserve longtemps à la glacière, sans se colorer. L'inconvénient majeur de ce procédé, qui

nous a causé des ennuis pendant la préparation du chlorure de carbobenzoxy par cette méthode, est le danger de solidification de l'alcool benzylique (p.f. -15º) dès que la chaleur de la réaction exothermique n'est pas suffisante (par mauvais réglage du courant de $COCl_2$) pour empêcher la baisse de température du mélange réactionnel.

Pour cette raison, nous avons modifié la méthode de FARTHING en inversant l'ordre d'addition des réactifs : au lieu de passer le $COCl_2$ gaz à travers l'alcool benzylique refroidi, on ajoute graduellement l'alcool benzylique dans du phosgène liquide (point d'ébullition + 8,2º, point de fusion -118º) refroidi par un mélange d'alcool et de carboglace. L'opération est effectuée sous une hotte à très bonne ventillation, et en portant obligatoirement un masque à gaz. On utilise un ballon de 3 litres à 3 tubulures avec rodages normalisés, muni d'un agitateur mécanique, d'un tube de sortie de gaz, communiquant avec un piège pour le $COCl_2$ (solution de soude) et d'une ampoule à brome pour l'addition, goutte à goutte, de l'alcool benzylique. Le ballon est refroidi dans un mélange d'éthanol et de carboglace. Les ampoules de phosgène liquide sont refroidies à -30º, et leur contenu (de quantité connue) est versé directement dans le ballon refroidi.

Pour 511 g de phosgène liquide, on ajoute graduellement 511 g d'alcool benzylique fraichement distillé. L'addition de l'alcool dure 4 heures (température du bain réfrigérant -20º à -25º). On continue l'agitation pendant encore 4 heures à cette température et ensuite on laisse monter lentement la température. On chasse l'excès de $COCl_2$ et HCl en faisant passer à travers la solution, un courant d'air sec, et l'on achève l'évacuation du $COCl_2$ par le vide de la trompe à eau. Une légère coloration violacée du liquide obtenu, avant l'évacuation du $COCl_2$, en excès, disparait peu à peu pendant l'élimination de ce gaz.

On obtient ainsi 775 g d'un liquide complètement incolore, de poids spécifique 1,21, dont la concentration en chlorure de carbobenzoxy est déterminée par la prépa-

ration du benzylcarbamate suivant la méthode de CARTER et coll. (209). Le rendement est de l'ordre de 93 à 96 %. Ce produit se conserve à la glacière sans se colorer.

Indépendamment de notre travail, KATCHALSKI a décrit un procédé analogue pour la préparation du chlorure de carbobenzoxy (242b).

Nous avons utilisé la même méthode et le même dispositif pour la préparation du chlorocarbonate de sec.butyle et du chlorocarbonate d'isobutyle à partir des alcools correspondants.

o-Phénylène chlorophosphite

La préparation de ce réactif a été effectuée suivant la méthode de ANSCHUTZ et coll. (264).

On dissout 50 g de pyrocatéchol dans 125 cc d'éther technique et on ajoute graduellement en une heure 94 g de trichlorure de phosphore (redistillé) ; immédiatement un abondant dégagement de HCl commence. Après l'addition de toute la quantité de PCl_3, on chauffe à reflux pendant 5 heures et on laisse ensuite pendant 12 heures à la température ordinaire. On obtient l'o-phénylène chlorophosphite par distillation fractionnée sous 16 mm Hg à 90-91º. On recueille 71 g (rendement 90 %).

Récemment RYDON et coll. (142b) ont décrit la préparation de ce réactif sans utiliser de solvant.

B I B L I O G R A P H I E

1. T. Curtius, Ber., 35, 3226 (1902).
2. E. Fischer et E. Fourneau, Ber. 34, 2868 (1901).
3. F. Hofmeister, Ergeb. Physiol., 1, 159 (1902).
4. E. Fischer, Chem. Zt., 26, 939 (1902).
5. E. Fischer, Ber., 39, 530 (1906).
6. B. Osborne et S.H. Clapp, Am. J. Physiol., 18, 123 (1907).
7. E. Fischer et A. Luniak, Ber. 42, 4752 (1909).
8. E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide u. Proteine, 1899-1906, J. Springer, Berlin 1906 p. 39.
9. E. Fischer, Ber. 36, 2094 (1903).
10. E. Fischer et E. Otto, Ber., 36, 2106 (1903).
11. E. Fischer, Ber. 40, 1754 (1907).
12. E. Abderhalden et A. Fodor, Ber. 49, 561 (1916).
13. M. Bergmann et L. Zervas, Ber., 65, 1192 (1932).
14. M. Bergmann, L. Zervas, L. Salzmann et H. Schleich, Z. physiol. Chem., 224, 17 (1934).
15. a) M. Bergmann, L. Zervas et J.P. Greenstein, Ber., 65, 1692 (1932).
    b) M. Bergmann, L. Zervas et W.F. Ross, J. Biol. Chem., 111, 245 (1935).
16. M. Bergmann, L. Zervas et H. Rinke, Z. physiol. Chem., 224, 40 (1934).
17. H.S. Loring et V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., 111, 385 (1935).
18. R.H. Sifferd et V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., 108, 753 (1935).
19. C.R. Harrington et T.H. Mead, Biochem. J., 29, 1602 (1935).
20. V. du Vigneaud et G.L. Miller, J. Biol. Chem., 116, 469 (1936).
21. a) M. Bergmann et J.S. Fruton, Advances in Enzymol., 1, 63 (1941).
    b) M. Bergmann, Advances in Enzymol., 2, 49 (1942).
22. J.S. Fruton, Advances in Protein Chem., 5, 1 (1949).
23. E. Bricas et Cl. Fromageot, Advances in Protein Chem., 8, 1 (1953).
24. R. Schwyzer, Chimia, 12, 53 (1958).
25. R.L.M. Synge, Biochem. J., 39, 363 (1945).
26. W. Grassmann et E. Wünsch, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 13, 445 (1956).
27. M. Goodman et G.W. Kenner, Advances in Protein Chem., 12, 465 (1957).

28. a) V. du Vigneaud, C. Ressler, J.M. Swan, C.W. Roberts, P.G. Katsoyannis et S. Gordon, J. Am. Chem. Soc., 75, 4879 (1953).

b) V. du Vigneaud, C. Ressler, J.M. Swan, C.W. Roberts et P.G. Katsoyannis, J. Am. Chem. Soc., 76, 3107 à 3115 (1954).

c) M. Bodanszky et V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 81, 5688 (1959).

29. G.W. Anderson cité par V. du Vigneaud, Ann. N.Y. Acad. Sci., 88, 537 (1960).

30. R.A. Boissonnas, St. Guttmann, P.A. Jaquenoud et J.P. Waller, Helv. Chim. Acta, 38, 1491 (1955).

31. J. Rudinger, J. Honzl et M. Zaoral, Chem. Listy, 50, 288 (1956) et Collection Czechoslov. Chem. Communs, 21, 202 (1956).

32. M. Bodanszky, M. Szelke, E. Tomorkeny et E. Weiss, cité par L. Gyermek et G. Fekete, Experientia, 11, 238 (1955).

33. L. Velluz, G. Amiard, V. Bartos, B. Goffinet et R. Heymes, Bull. Soc. Chim., 1956, 1464.

34. H.C. Beyerman, J.S. Bontekoe et A.C. Koch, Rec. trav. chim., 78,935 (1959).

35. a) M.F. Bartlett, A. Jöhl, R. Roeske, R.J. Stedman, F.H.C. Stewart, D.N. Ward et V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 78, 2905 (1956).

b) V. du Vigneaud, M.F. Bartlett et A. Jöhl, J. Am. Chem. Soc., 79,5572(1957).

c) M. Bodanszky, J. Meienhofer et V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 82, 3195 (1960).

36. R.A. Boissonnas et R.L. Huguenin, Helv. Chim. Acta, 43, 182 (1960).

37. V. du Vigneaud, D.T. Gisch, P.G. Katsoyannis et G.P. Hess, J. Am. Chem. Soc., 80, 3355 (1958).

38. G.T. Young, 3ème Symposium Européen des Peptides, Bâle (1960).

39. P.G. Katsoyannis et V. du Vigneaud, [illegible], J. Biol. Chem., 233, 1352 (1958).

40. R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel et H. Zuber, Helv. Chim. Acta, 41, 1273 (1958).

41. E. Wünsch, 2ème Symposium Européen des Peptides, Münich (1959), résumé Angew. Chem., 71, 741 (1959).

42. H. Schwarz, F.M. Bumpus et I.H. Page, J. Am. Chem. Soc., 79, 5697 (1957).

43. a) W. Rittel, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker et R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta, 40, 614 (1957).

b) R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel et H. Zuber, Helv. Chim. Acta, 41, 1287 (1958).

44. R. Paul et G.W. Anderson, cité par G.W. Anderson, Ann. N.Y. Acad. Sci., 88, 676 (1960).

45. L.T. Skeggs Jr. K.E. Lentz, J.R. Kahn et N.P. Shumway, J. Exptl. Med., 108, 283 (1958).

46. a) R.A. Boissonnas, St. Guttmann, P.A. Jaquenoud, H. Konzett et E. Sturmer, Experientia, 16, 326 (1960).

b) R.A. Boissonnas, St. Guttmann et P.A. Jaquenoud, Helv. Chim. Acta, 43, 1349 (1960).

47. R. Schwyzer, W. Rittel, P. Sieber, H. Kappeler et H. Zuber, Helv. Chim. Acta, 43, 1131 (1960).

48. E.D. Nicolaides, H.A. De Wald, P.G. Shorley et H.O.J. Collier, Nature, 187, 773 (1960).

49. St. Guttmann et R.A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta, 42, 1257 (1959).

50. a) K. Hofmann, H. Yajima et E. Schwartz, J. Am. Chem. Soc., 82, 3732 (1960).

b) K. Hofmann, Ann. N.Y. Acad. Sci., 88, 689 (1960).

51. R. Schwyzer, H. Kappeler, B. Iselin, W. Rittel et H. Zuber, Helv. Chim. Acta, 42, 1702 (1959).

52. K. Hofmann, H. Yajima, N. Yanaihava, T. Liu et S. Lande, J. Am. Chem. Soc., 83, 487 (1961`

53. R.A. Boissonnas, St. Guttmann, J.P. Waller et P.A. Jaquenoud, Experientia, 12, 44 (1956).

54. R. Schwyzer, W. Rittel, H. Kappeler, B. Iselin, Angew. Chem., 72, 915 (1960).

55. C.H. Li, J. Meinhofer, E. Schnabel, D. Chung, T.B. Lo et J.Ramachandran, J. Am. Chem. Soc., 82, 5760 (1960).

56. E. Schröder et H. Gibian, Z. Naturforsch., 15b, 814 (1960).

57. R.B. Merrifield et D.W. Woolley, J. Am. Chem. Soc., 78, 4646 (1956) et 80, 6635 (1958).

58. G.L. Tritsch et D.W. Woolley, J. Am. Chem. Soc., 82, 2787 (1960).

59. K. Okawa, Bull. Chem. Soc. Japan, 31, 88 (1958).

60. R. Schwyzer, P. Sieber, Angew. Chem., 68, 518 (1956), Helv. Chim.Acta, 40, 624 (1957).

61. a) R. Schwyzer et P. Sieber, Helv. Chim. Acta, 42, 972 (1959).

b) R. Schwyzer, E. Surbeck-Wegmann et H. Diettrich, Chimia, 14, 366 (1960).

62. H. Brockmann et H. Lackner, Naturwissenschaften, 47, 230 (1960).

63. K. Vogler, P. Lanz et W. Lergier, Experientia, 15, 334 (1959).

64. a) G.W. Anderson, J. Blodinger et A. Welcher, J. Am. Chem. Soc.,74,5309(1952).

b) P. Ben Ishai et A. Berger, J. Org. Chem., 17, 1564 (1952), 19,62 (1954).

c) R.A. Boissonnas et G. Preitner, Helv. Chim. Acta, 36, 875 (1953).

65. F.H. Carpenter et D.T. Gish, J. Am. Chem. Soc., 74, 3818 (1952).

66. R. Schwyzer, P. Sieber et K. Zatsko, Helv. Chim. Acta, 41, 491 (1958).

67. F.C. Mckay et N.F. Albertson, J. Am. Chem. Soc., 79, 4686 (1957).

68. L.A. Carpino, J. Am. Chem. Soc., 79, 98, 4427 (1957).

69. G.W. Anderson et A.C. McGregor, J. Am. Chem. Soc., 79, 6180 (1957).

70. R. Schönheimer, Z. physiol. Chem., 154, 203 (1926).

71. V. du Vigneaud et O.K. Behrens, J. Biol. Chem., 117, 27 (1936).

72. H.B. Milne et C.H. Peng, J. Am. Chem. Soc., 79, 639 (1957).

73. a) L. Velluz, G. Amiard, R. Heymes, Bull. Soc. Chim., 1954, 1012.

b) L. Velluz, J. Anatol et G. Amiard, Bull. Soc. Chim., 1954, 1449.

74. J. Anatol et V. Torelli, Bull. Soc. Chim., 1954, 1446.

75. B. Helferich, L. Moog et A. Junger, Ber. 58, 872 (1925).

76. G. Amiard, R. Heymes et L. Velluz, Bull. Soc. Chim., 1955, 191.

77. a) L. Zervas et D.M. Theodoropoulos, J. Am. Chem. Soc., 78, 1359 (1956).

b) G.C. Stellakatos, D.M. Theodoropoulos et L. Zervas, J. Am. Chem. Soc., 81, 2884 (1959).

78. F. Weygand et E. Csendes, Angew. Chem., 64, 136 (1952).

79. E.F. Schallenberg et M. Calvin, J. Am. Chem. Soc., 77, 2779 (1955).

80. D.A. King et F.E. Kidd, Nature, 162, 776 (1948).

81. J.C. Sheehan et V.S. Frank, J. Am. Chem. Soc., 71, 1856 (1949).

82. G.H.L. Nefkens, Nature, 185, 309 (1960).

83. H.R. Ing et R.H.F. Manske, J. Chem. Soc., 1926, 2348.

84. I. Schumann et R.A. Boissonnas, Nature, 169, 154 (1952).

85. S.G. Waley, Chem. and Ind., 1953, 107.

86. J.C. Sheehan et D.D.H. Yang, J. Am. Chem. Soc., 80, 1154 (1958).

87. G. Losse et W. Zönnchen, Angew. Chem., 72, 385 (1960).

88. G.C.H. Ehrenswärd, Nature, 159, 500 (1947).

89. J. Kollonitsch, A. Hajös et F. Gabor, Nature, 177, 841 (1956).

90. S.G. Waley et J. Watson, J. Chem. Soc., 1953, 475.

91. J.A. Maclaren, Australian J. Chem., 11, 360 (1958).

92. C.W. Roberts, J. Am. Chem. Soc., 76, 6203 (1954).

93. H.K. Miller et H. Waelsch, J. Am. Chem. Soc., 74, 1092 (1952).

94. B.F. Erlanger et R.M. Hall, J. Am. Chem. Soc., 76, 5781 (1954).

95. J.D. Cipera et R.V.V. Nicholls, Chem. and Ind., 1955, 16.

96. H. Schwarz et K. Arakawa, J. Am. Chem. Soc., 81, 5691 (1959).

97. R.W. Roeske, Chem. and Ind., 1959, 1121.

98. E. Tachner, B. Liberek, C. Wasielewski et J. Biernat, 2ème Symposium sur les Peptides, Münich et Z. angew. Chem., 71, 743 (1959).

99. A. Vollmar et M.S. Dunn, J. Org. Chem., 25, 385 (1960).

100. G.W. Anderson et F.M. Callahan, J. Am. Chem. Soc., 82, 3359 (1960).

101. M. Goodman et K.C. Stueben, J. Am. Chem. Soc., 81, 3980 (1959).

102. K. Hofmann, A. Lindemann, M.Z. Magee et N.H. Khan, J. Am. Chem. Soc., 74, 470 (1952).

103. F. Weygand et W. Steglich, Chem. Ber., 92, 313 (1959).

104. a) T. Wieland et R. Sehring, Ann., 569, 122 (1950).

b) T. Wieland, W. Kern et R. Sehring, Ann. 569, 117 (1950).

105. J.R. Vaughan Jr. et R.L. Osato, J. Am. Chem. Soc., 73, 5533 (1951).

106. T. Wieland et H. Bernhard, Ann., 572, 190 (1951).

107. R.A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta, 34, 874 (1951).

108. J.R. Vaughan Jr. et R.L. Osato, J. Am. Chem. Soc., 74, 676 (1952).

109. a) G.W. Kenner et R.J. Stedman, J. Chem. Soc., 1952, 2069.

b) D.W. Clayton, J.A. Farrington, G.W. Kenner et J.M. Turner, J. Chem. Soc., 1957, 1398.

110. a) G.W. Anderson et R.W. Young, J. Am. Chem. Soc., 74, 5307 (1952).

b) R.W. Young, K.H. Wood, R.J. Joyce et G.W. Anderson, J. Am. Chem. Soc., 78, 2126 (1956).

111. T. Wieland et B. Heinke, Ann., 599, 70 (1956).

112. A.R. Emery et V. Gold, J. Chem. Soc., 1950, 1443, 1447, 1455.

113. a) M.B. Hoagland, Biochim. Biophys. Acta, 16, 288 (1955).

b) G.N. Cohen et F. Gros, Ann. Rev. Biochem., 29, 525 (1960).

114. T. Wieland, W. Schäfer et E. Bokelmann, Ann., 573, 99 (1951).

115. R. Schwyzer, B. Iselin et M. Feurer, Helv. Chim. Acta, 38, 69, 80, 83 (1955).

116. a) M. Bodanszky, Nature, 175, 685 (1955).

b) M. Bodanszky, M. Szelke, E. Tömörkeny et E. Weiss, Chem. and Ind., 1955, 1517.

117. B. Iselin, W. Rittel, P. Sieber et R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta, 40, 373 (1957).

118. M. Rothe et F.W. Kunitz, Ann. 609, 88 (1957).

119. D.F. Elliott et D.W. Russell, Biochem. J., 66, 49p (1957).

120. a) J.A. Farrington, G.W. Kenner et J.M. Turner, Chem. and Ind., 1955, 601.

b) J.A. Farrington, P.J. Hextall, G.W. Kenner et J.M. Turner, J. Chem. Soc., 1957, 1407.

121. a) H.G. Zachau, G. Acs et F. Lipmann, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, 885 (1958).

b) J. Preis, P. Berg, E.J. Ofengand, F.M. Bergmann et M. Diekmann, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 45, 319 (1959).

122. J.C. Sheehan et G.V. Hess, J. Am. Chem. Soc., 77, 1067 (1955).

123. H.G. Khorana, Chem. and Ind., 1955, 1087.

124. M. Smith, J.G. Moffat et H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 80, 6204 (1958).

125. a) Communication privée du Prof. H. Zahn et b) thèse de H. Schüssler, Technische Hochschule Aachen (Aix-la-Chapelle) 1960.

126. M. Buzas, C. Egnell et P. Fréon, Compt. Rend., 252, 896 (1961).

127. a) P. Berg, J. Biol. Chem., 233, 608 (1958).

b) D.J. McCorquodale et G.C. Mueller, Arch. Biochem. Biophys., 77, 13 (1958).

c) K. Moldave, P. Castelfranco et A. Meister, J. Biol. Chem., 234, 841 (1959).

d) N.K. Kochetkow, V.A. Derevitskaya et L.M. Likhosherstov, Chem. and Ind., 1960, 1532.

128. C.L. Stevens et M.E. Munk, J. Am. Chem. Soc., 80, 4069 (1958).

129. R.J. Cremly, G.W. Kenner et A. Todd, J. Chem. Soc., 1960, 4511.

130. G. Losse et Weddige, Ann. 636, 144 (1960).

131. a) J.F. Arens, Rec. trav. chim. Pays-Bas, 74, 769 (1955).

b) J.F. Arens, 3ème Symposium Européen sur la Synthèse des Peptides, Bâle 1960 et Chimia, 14, 366 (1960).

c) H.J. Panneman, A.F. Marx et J.F. Arens, Rec. trav. chim. Pays-Bas, 78, 489 (1959).

132. a) G.W. Anderson et R. Paul, J. Am. Chem. Soc., 80, 4423 (1958).

b) R. Paul et G.W. Anderson, J. Am. Chem. Soc., 82, 4596 (1960).

133. H.A. Staab, Ann. 609, 75 (1957).

134. H.A. Staab, Angew. Chem., 71, 194 (1959).

135. W. Ried et B. Schleimer, Ann., 626, 98 (1959).

136. M. Zaoral et Z. Arnold, Tetrahedron Letters, n°14, 9 (1960).

137. S. Goldschmidt et M. Wick, Z. Naturforsch., 5b (1950) et Ann., 575, 217 (1952).

138. S. Goldschmidt et H. Lautenschlager, Ann., 580, 68 (1953) et travaux postérieurs.

139 a) S. Goldschmidt et G. Rosculet, Chem. Ber., 93, 2387 (1960)

b) W. Grassmann et E. Wünsch, Chem. Ber., 91, 449 et 455 (1958).

140. G.W. Anderson, J. Blodinger, R.W. Young et A.D. Welcher, Chem. Soc., 74, 5304 (1952).

141. G. Schramm et H. Wissmann, Chem. Ber., 91, 1073 (1958).

142. a) H.N. Rydon, 2ème Symposium Européen sur la Synthèse des Peptides, Münich et Angew. Chem., 71, 741 (1959).

b) P.C. Crofts, J.H.H. Merkes et H.N. Rydon, J. Chem. Soc., 1958, 4250 et 1959, 3610.

143. P. Edmann, Ann. Rev. Biochem., 28, 69 (1959).

144. M. Bodanszky et V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 81, 2504 (1959).

145. a) J.R. Vaughan Jr., J. Am. Chem. Soc., 74, 6137 (1952).

b) J.R. Vaughan Jr. et J.A. Eichler, J. Am. Chem. Soc., 75, 5556 (1953).

146. B.F. Erlanger, H. Sachs et E. Brand, J. Am. Chem. Soc., 76, 1806 (1954).

147. H. Schwarz et F.M. Bumpus, J. Am. Chem. Soc., 81, 890 (1959).

148. G.W. Anderson et F.M. Callahan, J. Am. Chem. Soc., 80, 2902 (1958).

149. a) M.B. North et G.T. Young, Chem. and Ind., 1955, 1597.

b) G.T. Young, M.B. North et N.A. Smart, Résumés des Comm. du XVIème Congrès Internat. de Chimie pure et appliquée, Paris, 1957, tome II, p. 238.

150. a) G.T. Young, Proc. Symposium on Methods of Peptido Synthesis, Prague, 1958, (Coll. Czech. Chem. Comm., 24, 39 (1959)).
b) N.A. Smart, G.T. Young et M.N. Williams, J. Chem. Soc., 1960, 3902.
151. B. Hegedüs, Angew. Chem., 71, 702 (1959).
152. R. Schwyzer, Angew. Chem., 71, 742 (1959).
153. .B. Iselin, Arch. Biochem. Biophys., 78, 532 (1958).
154. B.Iselin et.R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta, 44, 169 (1961).
155. J.W. Hinman, E.L. Caron et H. Christensen, J. Am. Chem. Soc., 72, 1620 (1950).
156. H. Sachs et E. Brand, J. Am. Chem. Soc., 76, 1815 (1954).
157. H. Zahn et N.H. La France, Ann, 630, 26 (1960).
158. a) E. Katchalski, Advances in Protein Chem., 6, 123 (1951).
b) E. Katchalski, Advances in Protein Chem., 13, 243 (1958).
159. J.L. Bailey, Nature, 164,889 (1949) et J. Chem. Soc., 1950, 3461.
160. a) J. Rudinger et F. Sorm, Collection Czech. Chem. Commun., 16, 214 (1951).
b) M. Zaoral et J. Rudinger, Collection Czech. Chem. Commun., 20, 1183 (1955).
c) J. Honzl et J. Rudinger, Collection Czech. Chem. Commun., 20, 1190 (1955).
161. B.M. Iselin et R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta, 43, 1760 (1960).
162. St. Guttmann, Chimia, 14, 368 (1960).
163. M. Bodanszky et C.A. Birkhimer, Chimia, 14, 368 (1960).
164. E.A. Barnard et W.D. Stein, Advances in Enzymol., 20, 51 (1958).
165. O. Gerngross, Ber. 46, 1908 (1913) et Z. physiol. Chem., 108, 50 (1920).
166. K. Hofmann, Imidazole and its derivatives, Part I, Intersience Pub.,New York; 1953, p. 201.
167. M. Bergmann et L. Zervas, Z. physiol. Chem., 175, 145 (1928).
168. T. Wieland et G. Schneider, Ann. 580, 159 (1953).
169. G.W. Anderson, A.C. Mc. Gregor et R.W. Young, J. org. Chem., 23, 1236 (1958).
170. R.W. Holley et E. Sondheimer, J. Am. Chem. Soc., 76, 1326 (1954).
171. R.F. Fisher et R.R. Whetstone, J. Am. Chem. Soc., 76, 5076 (1954).
172. N.C. Davis, J. Biol. Chem., 223, 935 (1956).
173. K. Hofmann, H. Kappeler, A.E. Furlenmeier, M.E. Woolner, E.T. Schwarz et T.A. Thompson, J. Am. Chem. Soc., 79, 1641 (1957).
174. I. Photaki, D. Schäufele, S. Fallab et H. Erlenmeyer, Helv. Chim. Acta,40,187(195
175. G. Weitzel, F. Schneider et A.M. Fretzdorff, Z. physiol. Chem., 307, 23 (1957).
176. F. Schneider, Z. physiol. Chem., 321, 38 (1960).
177. P. G. Katsoyannis et V. du Vigneaud, Arch. Biochem. Biophys., 78, 555 (1958).
178. K. Okawa, Bull. Chem. Soc. Japan, 30, 976 (1957).

179. E. Helferich et H. Böshagen, Chem. Ber., 92, 2813 (1959).
180. V. du Vigneaud et O.K. Behrens, J. Biol. Chem., 117, 27 (1937).
181. G. Stelakatos, Thèse de Doctorat, Université d'Athènes, 1954, p. 23 et 25.
182. G. Amiard, R. Heymès et L. Velluz, Bull. Soc. Chim., 1955, 1464.
183. A. Patchornik, A. Berger et E. Katchalski, J. Am. Chem. Soc., 76, 6416 (1957).
184. a) S. Akabori, K. Okawa et F. Sakiyama, Nature, 181, 773 (1957).
b) F. Sakiyama, K. Okawa, T. Yamakawa et S. Akabori, Bull.Chem. Soc. Japan, 31, 926 (1958).
185. D.F. Elliott et D. Morris, Chimia, 14, 373 (1960).
186. R.A. Boissonnas, St Guttmann, R.L. Hugenin, P.A. Jaquenoud et A. Sandrin, Helv. Chim. Acta, 41, 1867 (1958).
187. F. Leitner, Thèse de Doctorat, Université de Genève, 1955, p. 11 et 16.
188. D. Theodoropoulos, J. org. Chem., 21, 1550 (1956).
189. R. Schwyzer et C.H. Li, Nature, 182, 1669 (1958).
190. B.G. Overell et V. Petrow, J. Chem. Soc., 1955, 232.
191. A. Winterstein, B. Hegedüs, B. Fust, E. Böhni et A. Studer, Helv. Chim. Acta, 39, 229 (1956).
192. A. Patchornik, A. Berger et E. Katchalski, J. Am. Chem. Soc., 79, 5227 (1957).
193. E. Bricas et C. Nicot-Gutton, Bull. Soc. Chim., 1960, 466.
194. Communication privée du Professeur V. du Vigneaud, du 23-9-1960
195. a) D. Theodoropoulos et G. Fölsch, Acta Chem. Scand., 12, 1955 (1958).
b) D. Theodoropoulos, Acta Chem. Scand., 12, 2043 (1958).
196. a) C.H. Li, E. Schnabel et D. Chung, J. Am. Chem. Soc., 82, 2062 (1960).
b) E. Schnabel et C.H. Li, J. Am. Chem. Soc., 82, 4576 (1960).
197. R. Roeske, F.H.C. Stewart, R.J. Stedman et V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 78, 5883 (1956).
198. S.J. Leach et H. Lindley, Austral. J. Chem., 7, 173 (1954).
199. R.G. Jones et K.C. McLaugin, J. Am. Chem. Soc., 71, 2444 (1949).
200. E. Braun-Menendez et H. Page, Nature, 181, 1061 (1958).
201. D. Theodoropoulos et J. Gazopoulos, J. Chem. Soc., 1960, 3561.
202. M. Brenner et W. Huber, Helv. Chim. Acta, 36, 1110 (1953).
203. E. Fischer et A. Speier, Ber. 28, 3252 (1895).
204. a) R.W. Cowgill, Anal. Chem., 27, 1519 (1955).
b) I. Smith, Chromatographic Techniques, W. Heinemann, Londres, 1958, p.144.
205. H.N. Rydon et P.W.G. Smith, Nature, 169, 922 (1952).

206. F. Reindel et W. Hoppe, Chem. Ber., 87, 1103 (1954).

207. T.B. Moore et C.G. Baker, J. Chromatog., 1, 513 (1958).

208. K. Schlögl, A. Siegel et F. Wessely, Z. physiol.Chem., 291, 265 (1952).

209. H.E. Carter, R.L. Frank et H.W. Johnson, Org. Synth., vol. 23 p.13 et Coll. Vol. III p. 167 (1955).

210. R.B. Woodward, R.A. Olofson et H. Mayer, J. Am. Chem. Soc., 83, 1010 (1961).

211. a) P. Desnuelle et C. Fabre, Biochim. Biophys. Acta, 18, 49 (1955).

b) C. Gabeloteau-Fabre, Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, Marseille, 1957.

212. H. Neurath et G.W. Schwert, Chem. Rev., 46, 69 (1950).

213. a) F. Sanger et H.T. Tuppy, Biochem. J., 49, 481 (1951).

b) F. Sanger et E.O.P. Thompson, Biochem. J., 53, 366 (1953).

214. a) P. Desnuelle et M. Rovery, 3ème Congrès International de Biochimie, Bruxelles 1955, Conférences et Rapports, p. 78.

b) H. Neurath, 3ème Congrès International de Biochimie, Bruxelles 1955, Conférences et Rapports, p. 89.

215. H. Neurath, Advances in Protein Chem., 12, 319 (1957).

216. E.W. Davie et H. Neurath, J. Biol. Chem., 212, 515 (1955).

217. P. Desnuelle et C. Gabeloteau, Arch. Biochem. Biophys., 69, 475 (1957).

218. J.F. Pechère, G.H. Dixon, R.H. Maybury et H. Neurath, J. Biol. Chem., 233, 1364 (1958).

219. B. Iselin, M. Feurer et R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta, 38, 1508 (1955).

220. P.A. Jaquenoud, Thèse de Doctorat, Université de Genève, 1955, p. 6 et 13.

221. C. Ressler et V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 79, 4511 (1957).

222. K. Schlögl et H. Fabitschowitz, Monatsh. Chem., 84, 939 (1953).

223. E.L. Smith, D.H. Spackman et W.J. Polglase, J. Biol. Chem., 199, 801 (1952).

224. D. Theodoropoulos et L. Craig, J. Org. Chem., 20, 1169 (1955).

225. M. Winitz, L. Bloch-Frankenthal, N. Izumiya, S.M. Birnbaum, C.G. Baker et J.P. Greestein, J. Am. Chem. Soc., 78, 2423 (1956).

226. P.A. Jaquenoud et R.A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta, 44, 113 (1961).

227. a) A.C. Kurtz, J. Biol. Chem., 122, 477 (1938).

b) A.C. Kurtz, J. Biol. Chem., 140, 705 (1941).

c) A.C. Kurtz, J. Biol. Chem., 180, 1253 (1949).

228. A. Neuberger et F. Sanger, Biochem. J., 37, 515 (1943).

229. R. Schwyzer et W. Rittel, Helv. Chim. Acta, 44, 159 (1961).

230. K. Hofmann, E. Stutz, G. Spühler, H. Yajima et E. Schwartz, J. Am. Chem. Soc. 82, 3727 (1960).

231. K. Hofmann, T.H. Thompson, M.E. Wolner, G. Spühler, H. Yazima, J.D. Cipera et E.T. Schwartz, J. Am. Chem. Soc., 82, 3721 (1960).
232. H.C. Beyerman, J.S. Bontekoe, Rec. trav. chim., 79, 1034, 1044, 1050, 1065(1960)
233. A. et G. Hillmann, Z. Naturforsch., 6b, 340 (1951).
234. M. Zaoral, Proc. Symposium on Methods of Peptide Synthesis, Prague 1958 (Collection Czech. Chem. Commun., numéro spécial 24, 33 (1959).
235. V. Prelog et P. Wieland, Helv. Chim. Acta, 29, 1128 (1946).
236. M. Brenner et C.H. Burckhardt, Helv. Chim. Acta, 34, 1070 (1951).
237. J.A. Maclaren, W.E. Savige et J.M. Swan, Proc. International Wool Textile Research Conf. (Australie) C-164 (1955) et Australian J. Chem., 11, 345(1958).
238. J. Rudinger et J. Honzl, 3ème Symposium Européen sur la Synthèse peptidique Bâle 1960, Chimia, 14, 367 (1960).
239. W.J. Le Quesne et G.T. Young, J. Chem. Soc., 1952, 24.
240. J.D. John et G.T. Young, J. Chem. Soc., 1954, 2870.
241. A.R. Battersby et J.C. Robinson, J. Chem. Soc., 1955, 259.
242. a) A. Berger et E. Katchalski, J. Am. Chem. Soc., 73, 4084 (1951).
b) E. Katchalski et A. Berger, Methods in Enzymology, edit. par Colowick et Kaplan, vol. III, p. 551, Academic Press, New York 1957.
243. Communication privée de E. Katchalski, de 3-4-1959.
244. P.M. Bryant, R.H. Moore, P.J. Pimplott et G.T. Young, J. Chem. Soc., 1959, 3868.
245. a) B.C. Barrass et D.T. Elmore, J. Chem. Soc., 1957, 4830.
b) B.C. Barrass et D.T. Elmore, J. Chem. Soc., 1957, 3134.
246. a) D.L. Swallow, I.M. Lockhart et E.P. Abraham, Biochem. J., 70, 359 (1958).
b) D.L. Swallow et E.P. Abraham, Biochem. J., 70, 364 (1958).
247. N. Izumiya, A. Nagamatsu et S. Ota, Kyushu Memoirs Med. Sciences, 4,7 (1953).
248. M.S. Dunn, E. Frieden, M.P. Stoddard et H.V. Brown, J. Biol. Chem., 144, 487 (1942).
249. G. Hillmann, Z. Naturforsch., 1, 682 (1946).
250. E. Abderhalden et H. Nienburg, Fermentforschung, 13, 573 (1954).
251. F. Sanger, Biochem. J., 39, 507 (1945).
252. D.F. Elliott et W.S. Peart, Biochem. J., 65, 246 (1957).
253. R.R. Porter et F. Sanger, Biochem. J., 42, 287 (1948).
254. B.F. Erlanger, W.V. Curran et N. Kokowsky, J. Am. Chem. Soc., 81, 3051 (1959).
255. D.W. Adamson, J. Chem. Soc., 1943, 39.

256. H.M. Flowers et W.S. Reith, Biochem. J., 53, 657 (1953).
257. R. Schwyzer et P. Sieber, Helv. Chim. Acta, 41, 1582 (1958).
258. L. Zervas, M. Winitz et J.P. Greenstein, J. Org. Chem., 22, 1515 (1957).
259. H. Sachs et E. Brand, J. Am. Chem. Soc., 75, 4610 (1953).
260. A. Miller, A. Neidle et H. Waelsch, Arch. Biochem. Biophys., 56, 11 (1955).
261. R.H. Karlson, K.S. Norland, G.D. Fasman et E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc., 82, 2268 (1960).
262. D. Coleman, J. Chem. Soc., 1951, 2294.
263. A.C. Farthing, J. Chem. Soc., 1950, 3213.
264. L. Anschütz, W. Broecker, R. Neher et A. Ohnheiser, Ber. 76, 218 (1943).

LISTE DES TABLEAUX ET SCHEMAS

TABLEAU I	Peptides naturels synthétisés entre 1953 et 1960	4 bis
TABLEAU II	Protection temporaire de la fonction amine	6 bis
TABLEAU III	Protection temporaire de la fonction carboxyle	7 bis
TABLEAU IV	Méthodes de couplage par les anhydrides mixtes	9 bis
TABLEAU V	Méthodes de couplage par les esters "activés"	10 bis
TABLEAU VI	Méthodes de couplage par l'intermédiaire des réactifs "activants"	15 bis
TABLEAU VII	Méthodes de couplage par "activation" de la fonction amine	17 bis
TABLEAU VIII	Valeurs R_F des dérivés de l'histidine et de ses peptides	79 bis
SCHEMA I	La synthèse peptidique par protection temporaire des groupements fonctionnels	5 bis
SCHEMA II	Synthèse du tétrapeptide C-terminal de l'angiotensine Val_5II	45 bis

TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION ..... I à V

PREMIERE PARTIE

ACQUISITIONS RECENTES DANS LE DOMAINE DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE

- Aperçu historique 1
- La période actuelle 5
- Synthèses peptidiques par protection temporaire des groupements fonctionnels 6
- Protection temporaire de la fonction amine 7
- Protection temporaire de la fonction carboxyle 8
- Protection temporaire dans le cas des acides aminés trifonctionnels 9
- Méthodes de couplage 10
- Méthode aux anhydrides mixtes 10
- Méthode aux esters "activés" 12
- Méthode aux réactifs "activants" 15
- Méthode par "activation" de la fonction amine 18
- Choix d'une méthode de couplage 20
- La racémisation pendant la synthèse peptidique 21
- La construction d'une chaine peptidique 25
- Nouvelles voies de la synthèse peptidique 27
- Conclusions 32

DEUXIEME PARTIE

SYNTHESE D'HISTIDYL-PEPTIDES PAR DES INTERMEDIAIRES PROTEGES SUR LE NOYAU IMIDAZOLIQUE. APPLICATION A LA SYNTHESE D'UN DERIVE TETRAPEPTIDIQUE DE LA SEQUENCE C-TERMINALE DE L'ANGIOTENSINE.

- Introduction 35
- Choix de groupements de protection et de méthodes de couplage. Essais préliminaires 39
- Résultats obtenus 46
- Résumé de la Deuxième Partie 52

TROISIEME PARTIE

SYNTHESE D'α-LYSYL-PEPTIDES DE LA SEQUENCE N-TERMINALE DU TRYPSINOGENE

- Introduction 55

- Problèmes envisagés. Méthodes utilisées. Résultats obtenus 59

- Résumé de la Troisième Partie 76

PARTIE EXPERIMENTALE 79

- A. Synthèse d'histidyl-peptides 80

- B. Synthèse du tétrapeptide C-terminal de l'angiotensine 88

- C. Synthèse de peptides de la séquence N-terminale du trypsinogène 92

- D. Préparation des réactifs 123

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES TABLEAUX, SCHEMAS

TABLE DES MATIERES

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

" Les hypertensines "

Vu et approuvé :

Paris, le 23 Mai 1961.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

J. PERES

Vu
et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH